



RELEVANCIA DE LA PROTEÍNA LISIL OXIDASA-*LIKE* 3 EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO Y EN LA INICIACIÓN Y PROGRESIÓN DEL MELANOMA

JOSÉ BUSTOS TAULER





Universidad Autónoma
de Madrid

Universidad Autónoma de Madrid

Programa de Doctorado en Biociencias Moleculares

**Relevancia de la proteína lisil oxidasa-*like* 3
en el desarrollo embrionario y en la
iniciación y progresión del melanoma**

José Bustos Tauler

Madrid, 2019

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Relevancia de la proteína lisil oxidasa-*like* 3 en el desarrollo embrionario y en la iniciación y progresión del melanoma

José Bustos Tauler

Graduado en Bioquímica

presenta esta memoria para optar al título de Doctor

por la Universidad Autónoma de Madrid

Directoras:

Dra. Amparo Cano García, Catedrática de la Universidad Autónoma de Madrid

Dra. Patricia González Santamaría, Doctora de la Universidad Autónoma de Madrid

Tutor:

Dr. Francisco Portillo Pérez, Catedrático de la Universidad Autónoma de Madrid

La presente tesis ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” de Madrid (CSIC-UAM), financiada por una Beca de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Economía y Competitividad



Dra. Amparo Cano García

Catedrática de la Universidad Autónoma de Madrid

Dra. Patricia González Santamaría

Doctora de la Universidad Autónoma de Madrid

CERTIFICAN:

Que **José Bustos Tauler**, graduado en Bioquímica por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina – Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (CSIC-UAM) de Madrid, el trabajo titulado “Relevancia de la proteína lisil oxidasa-*like* 3 en el desarrollo embrionario y en la iniciación y progresión del melanoma”.

El presente trabajo cumple, a nuestro juicio, con los requisitos necesarios para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral.

Madrid, octubre de 2019

Fdo. Amparo Cano García

Fdo. Patricia González Santamaría

Agradecimientos

Y por fin llegó el momento... de escribir los agradecimientos me refiero. Sin duda tengo mucho que agradecer aunque ya sabéis que no soy amigo de explayarme en estas cosas, pero es de justicia que profundice en ello.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directoras Amparo y Patricia por darme la oportunidad de cumplir la aspiración de ser doctor, que siempre he tenido desde que tengo la cabeza más o menos en su sitio; porque con vosotras he aprendido mucho, muchísimo, de ciencia y también de la vida. Quiero agradecer especialmente las correcciones de la tesis en verano para poder llegar a tiempo para que pueda continuar con mi siguiente paso laboral. Gracias de verdad.

Gracias a Bárbara. Es imposible condensar un porqué, en parte porque esto solo acaba de empezar; gracias porque "Eres tú". Gracias a mis padres, por darme la vida, la formación y la educación que me permiten ser libre y feliz. Gracias a Bárbara y a mis padres por ser mi fortaleza en los momentos más difíciles de la tesis, cuando ni si quiera yo confiaba en poder acabar. Gracias a mi familia: hijas, hermanos, cuñados, sobrinos, suegros... por ser un pilar fundamental que me llena de orgullo y me da fuerzas cada día. Especialmente gracias a mi suegra, por llegar donde nosotros no llegamos y encima, mejorarlo todo.

Gracias al laboratorio B16. Gran parte de la tesis es vuestra, ojalá os sintáis orgullosos de esta tesis tanto como yo. Si tuviera que ir uno por uno, necesitaría gran parte del Amazonas para acabar y, pensándolo bien, lo mejor del labo es que somos una piña. Cuando la ciencia o cualquier cosa no acompaña, nos apoyamos y nos reímos, cualquier cosa vale: Mercadona y sus novedades, las series... He pasado con vosotros el tiempo más determinante de mi vida y me lo he pasado muy bien, gracias.

Gracias a mis amigos por todos los momentos vividos, por haber compartido la vida. Gracias a los coleguitas, que siguen sin saber a qué me dedico pero que muy en el fondo me quieren. Gracias a todos los compañeros del departamento, de los servicios del IIB y personal de administración de la UAM.

Gracias a mis vecinos de Torre que me inocularon, y con quienes he compartido, el virus de la ciencia; y a mis profesores de biología. También gracias a quienes me dieron la oportunidad de empezar en la ciencia en el CIEMAT.

Gracias a los que os alegráis de que esta tesis salga adelante, con vosotros cuento para mirar al futuro.

Resumen

La familia de proteínas lisil oxidasa está formada por cinco miembros: la proteína lisil oxidasa prototípica (LOX) y 4 miembros lisil oxidasa-*like* 1 a 4 (LOXL1-4). Son proteínas secretadas que presentan actividad enzimática de desaminación oxidativa sobre residuos de lisina favoreciendo entrecruzamientos en moléculas de colágeno y elastina. El estudio de distintos modelos genéticos de ratón ha puesto de manifiesto la ausencia de redundancia funcional entre los diferentes miembros de la familia LOX y avalan la implicación de Loxl2 y Loxl3 en la correcta formación del sistema cardiovascular, respiratorio, músculo-esquelético o reproductor, entre otras funciones.

Algunas de las proteínas lisil oxidasa participan en la progresión tumoral y la metástasis de diversos tipos de cáncer ejerciendo funciones intracelulares e intranucleares. Resultados recientes del grupo han determinado que LOXL3 es esencial para la supervivencia de células de melanoma humano estando implicada en la correcta progresión del ciclo celular y en la respuesta al daño en el DNA, contribuyendo a mantener cierta estabilidad genómica necesaria para la progresión tumoral.

En la presente tesis hemos evaluado la relevancia de Loxl2 y Loxl3 durante el desarrollo embrionario, determinando que se requiere la expresión de *Loxl2* o de *Loxl3* a partir del estadio E9,5 para que los embriones lleguen a término. Además, la sobreexpresión de *Loxl2* rescata la letalidad perinatal asociada a la delección de *Loxl3*.

Por otra parte, hemos estudiado la implicación de Loxl3 en la generación y progresión del melanoma *in vivo*. Utilizando la línea de melanoma murino B16F10 hemos determinado que Loxl3 está implicada en la proliferación, capacidad clonogénica y de transformación y en la generación de metástasis a distancia. De hecho, la ausencia de *Loxl3* en melanocitos en el modelo genético murino que hemos desarrollado retrasa la aparición de las lesiones iniciales y su crecimiento, favoreciendo que aumente la supervivencia de los ratones con melanoma. Asimismo, Loxl3 tiene una función crítica en la diseminación linfática de las células de melanoma, subrayando su potencial como diana terapéutica en este tipo de cáncer.

Abstract

The lysyl oxidase family of proteins contains five members: prototypical lysyl oxidase (LOX) and lysyl oxidase-like proteins 1 to 4 (LOXL1-4). These secreted proteins present oxidative deamination enzymatic activity on lysine residues favoring crosslinks within collagen and elastin molecules. The study of different genetic mouse models has unveiled the absence of functional redundancy among different family members and supports the involvement of Loxl2 and Loxl3 in the development of the cardiovascular, respiratory, musculoskeletal or reproductive system, along with other functions.

Some lysyl oxidase protein members contribute to tumor progression and metastasis of various types of cancer through intracellular and intranuclear functions. Recent results from our group have established that LOXL3 is essential for the survival of human melanoma cells being involved in cell cycle progression and DNA damage response pathway, ultimately contributing to the maintenance of certain genomic stability required for tumor progression.

In the present thesis we have evaluated the relevance of Loxl2 and Loxl3 during mouse embryonic development, showing that the expression of *Loxl2* or *Loxl3* is required in embryos from E9,5 stage to reach full term development. In addition, the overexpression of *Loxl2* rescues the perinatal lethality associated with *Loxl3* deletion.

On the other hand, we have studied the *in vivo* involvement of Loxl3 in the generation and progression of melanoma. Using the B16F10 murine melanoma cell line, we have determined that Loxl3 is involved in proliferation, clonogenic capacity and transformation as well as in the generation of distant metastases. Accordingly, the absence of Loxl3 in melanocytes in the genetic mouse model that we have developed delays the onset and growth of the early lesions, favoring an extended survival of mice with melanoma. Additionally, Loxl3 has a critical role in the lymphatic dissemination of melanoma cells, underlining its potential as a therapeutic target in this type of cancer.

Índice

ÍNDICE	1
ÍNDICE DE TABLAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ABREVIATURAS	9
INTRODUCCIÓN	17
1. La familia de proteínas lisil oxidasa.....	17
1.1. Integrantes, estructura y función canónica.....	17
1.2. Regulación de la expresión de los genes <i>LOX</i> y sus distintas isoformas	20
1.3. Regulación postraducciona de los miembros de la familia <i>LOX</i> , secreción y localización intracelular	21
1.4. Función fisiológica de las proteínas lisil oxidasa.....	22
1.4.1. Modelos genéticos de ratón de los miembros de la familia <i>LOX</i>	22
1.4.2. Estudios de la función de los miembros de la familia <i>LOX</i> en sistemas <i>in vitro</i> ..	25
1.5. Implicación de los miembros de la familia <i>LOX</i> en patologías humanas no tumorales	26
1.6. Implicación de los miembros de la familia <i>LOX</i> en cáncer	29
1.6.1. TEM y el proceso de metástasis	29
1.6.2. Implicación de los miembros de la familia <i>LOX</i> en la progresión tumoral	30
1.6.3. <i>LOXL3</i> en cáncer	33
2. Melanoma	35
2.1. Biología del melanoma	36
2.2. Modelos genéticos murinos de melanoma	40

OBJETIVOS	47
MATERIALES Y MÉTODOS	51
1. Modelos de ratón	51
1.1. Generación del modelo de melanoma murino con delección condicional de <i>Lox/3</i> .	51
1.2. Generación de modelos genéticos con modificación constitutiva en los genes <i>Lox/2</i> y <i>Lox/3</i>	54
1.2.1. Modelo de doble delección de <i>Lox/2</i> y <i>Lox/3</i> (<i>L2-KO/L3-KO</i>)	54
1.2.2. Modelo de sobreexpresión de <i>Lox/2</i> y delección de <i>Lox/3</i> (<i>L2-KI/L3-KO</i>)	56
1.3. Genotipado de ratones	57
2. Líneas y cultivos celulares	59
2.1. Líneas celulares utilizadas	59
2.2. Vectores virales, producción de lentivirus e infecciones lentivirales	60
3. Ensayos celulares <i>in vitro</i>	61
3.1. Ensayos de proliferación	61
3.2. Crecimiento de colonias	62
3.3. Análisis del ciclo celular	63
3.4. Análisis de la apoptosis mediante citometría de flujo	63
4. Estudios <i>in vivo</i>	63
4.1. Tratamientos con 4-HT en el modelo murino de melanoma	63
4.2. Ensayos de tumorigénesis	65
4.3. Ensayos de metástasis experimental	66
4.4. Extracción de embriones en distintos estadios del desarrollo embrionario	66
4.5. Sacrificio de los animales	66
5. Procesamiento de tejidos, tumores y ganglios linfáticos	66

5.1. Preparación de bloques de parafina.....	66
5.2. Tinción de hematoxilina-eosina.....	67
6. Detección de proteínas	67
6.1. Análisis de proteínas mediante <i>western blot</i>	67
6.2. Análisis de proteínas mediante inmunohistoquímica (IHQ).....	69
7. Análisis de RNA.....	69
7.1. Extracción de RNA total de células y tejidos y síntesis de cDNA	69
7.2. Análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).....	70
8. Análisis estadísticos.....	71
RESULTADOS	75
1. Estudio de la implicación de <i>Lox/3</i> y <i>Lox/2</i> en el desarrollo embrionario	75
1.1. Análisis del desarrollo embrionario en ratones con delección de <i>Lox/2</i> y <i>Lox/3</i>	75
1.2. Generación de ratones con sobreexpresión de <i>Lox/2</i> y delección de <i>Lox/3</i>	78
2. Caracterización de la función de <i>Lox/3</i> en líneas celulares de melanoma murino	79
2.1. Efecto del silenciamiento de <i>Lox/3</i> en células de melanoma B16: estudios <i>in vitro</i>	79
2.1.1. Análisis de la proliferación y muerte celular	79
2.1.2. Análisis de la capacidad clonogénica y de transformación	81
2.2. Efecto del silenciamiento de <i>Lox/3</i> en células de melanoma B16: estudios <i>in vivo</i>	83
2.2.1. Ensayos de tumorigenicidad	83
2.2.2. Ensayos de metástasis experimental	84
3. Generación de un modelo de melanoma murino con pérdida de función de <i>Lox/3</i>	86
3.1. Generación y caracterización molecular del modelo de melanoma murino con delección condicional de <i>Lox/3</i>	86

3.2. Caracterización fenotípica del modelo de melanoma murino con delección condicional de <i>Loxl3</i>	88
3.3. Implicación de <i>Loxl3</i> en la melanomagénesis y la supervivencia.....	91
3.4. Implicación de <i>Loxl3</i> en la progresión metastática del melanoma murino: metástasis linfática	93
3.5. Estudio de la capacidad de metástasis a órganos vitales: metástasis pulmonar	97
3.6. Efecto de la delección de <i>Loxl3</i> en la expresión de marcadores de plasticidad celular en tumores primarios y metástasis linfáticas	100
DISCUSIÓN	105
1. Implicación de LOXL3 y LOXL2 en el desarrollo embrionario	105
1.1. La expresión de <i>Loxl2</i> o de <i>Loxl3</i> es necesaria para el desarrollo embrionario a partir del estadio E9,5.....	105
1.2. La sobreexpresión de <i>Loxl2</i> rescata la letalidad embrionaria asociada a la delección de <i>Loxl3</i>	107
2. <i>Loxl3</i> contribuye a la capacidad clonogénica y metastática de la línea de melanoma murino B16F10.....	108
3. Implicación de <i>Loxl3</i> en melanoma.....	110
3.1. <i>Loxl3</i> participa en la melanomagénesis, supervivencia y metástasis linfática	110
3.2. Contribución de <i>Loxl3</i> a la metástasis en órganos vitales	113
3.3. <i>Loxl3</i> y su relación con la plasticidad y diferenciación celular	115
3.4. <i>Loxl3</i> constituye una nueva diana terapéutica en melanoma	118
CONCLUSIONES	123
BIBLIOGRAFÍA	127

Índice de tablas

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Modelos genéticos de ratón de las proteínas lisil oxidasas (**pág. 23**)

Tabla 2. Patologías no tumorales relacionadas con las proteínas lisil oxidasas (**pág. 28**)

Tabla 3. Resumen de alteraciones moleculares frecuentes en melanoma cutáneo (**pág. 38**)

Tabla 4. Modelos genéticos de melanoma cutáneo promovidos por agentes carcinogénicos (**pág. 41**)

Tabla 5. Modelos genéticos de melanoma cutáneo no promovidos por carcinógenos (**pág. 42**)

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 6. Modelos genéticos utilizados durante el desarrollo de la tesis (**pág. 52**)

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para el genotipado de los distintos alelos (**pág. 59**)

Tabla 8. Secuencia diana de las horquillas cortas de RNA utilizados (**pág. 61**)

Tabla 9. Anticuerpos primarios (**pág. 68**)

Tabla 10. Anticuerpos secundarios (**pág. 68**)

Tabla 11. Secuencia de los oligonucleótidos usados para en el análisis mediante RT-qPCR (**pág. 71**)

RESULTADOS

Tabla 12. Genotipo de los embriones obtenidos a E13,5 a partir de cruces entre parentales heterocigotos *Lox12^{+/-}* X *Lox13^{+/-}LacZ* (**pág. 76**)

Tabla 13. Genotipo de los embriones obtenidos a E9,5 a partir de cruces entre parentales heterocigotos *Lox12^{+/-}* X *Lox13^{+/-}LacZ* (**pág. 76**)

Tabla 14. Genotipo de los embriones obtenidos a E11,5 a partir de cruces entre parentales heterocigotos *Lox12^{+/-}* X *Lox13^{+/-}LacZ* (**pág. 76**)

Tabla 15. Genotipos obtenidos de los animales analizados al destete tras el cruce *R26^{+/-}L2*; *Lox13^{+/-}LacZ* X *R26^{+/-}L2*; *Lox13^{+/-}LacZ* (**pág. 79**)

Índice de figuras

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Representación esquemática de los integrantes de la familia lisil oxidasa y de sus dominios estructurales (pág. 18)

Figura 2. Esquema de la reacción catalizada por la actividad lisil oxidasa entre moléculas de colágeno (pág. 19)

Figura 3. Vías de señalización en melanocitos alteradas frecuentemente en melanoma cutáneo (pág. 39)

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 4. Esquema génico de los alelos de *Lox/3* presentes en los distintos modelos (pág. 52)

Figura 5. Esquema génico de los alelos *Braf* y *Pten* y del transgén Cre::ER^{T2} del modelo de melanoma murino de Dankort y colaboradores (pág. 53)

Figura 6. Esquema de las distintas líneas utilizadas en la generación del modelo de melanoma murino con delección condicional de *Lox/3* (pág. 54)

Figura 7. Esquema génico de los alelos de *Lox/2* utilizados para el generar el ratón *Lox/2* KO (pág. 55)

Figura 8. Esquema del cruce utilizado para la generación del modelo de ratón con doble delección de *Lox/2* y *Lox/3* (pág. 55)

Figura 9. Esquema génico de los alelos del *locus R26* utilizados para la sobreexpresión (KI) de *Lox/2* (pág. 56)

Figura 10. Esquema de los cruces utilizados para la generación del modelo de sobreexpresión de *Lox/2* y delección de *Lox/3* (L2-KI/L3-KO) (pág. 57)

Figura 11. Listado de los ganglios linfáticos presentes en el ratón BALB/c y esquema de su localización anatómica (pág. 65)

RESULTADOS

Figura 12. Imágenes representativas de embriones de ratones *Lox/2*^{-/-} o *Lox/3*^{LacZ/LacZ} en estadios E9,5 (A) y E11,5 (B) y los correspondientes controles silvestre para ambos genes (pág. 77)

Figura 13. Efecto del silenciamiento de *Lox/3* sobre la proliferación, apoptosis y ciclo celular en la línea de melanoma murino B16F10 (pág. 81)

Figura 14. Análisis de la capacidad clonogénica y de transformación de la línea celular B16F10 tras el silenciamiento de la expresión de *Loxl3* (pág. 82)

Figura 15. Inyección ortotópica en ratones singénicos de células B16F10 control y silenciadas para la expresión de *Loxl3* (pág. 84)

Figura 16. Metástasis experimental de células B16F10 control e interferidas para *Loxl3* tras su inyección en la vena de la cola de ratonas C57BL/6JRj (pág. 85)

Figura 17. Comprobación mediante PCR de los cambios genéticos producidos por la recombinasa Cre en DNA genómico (pág. 88)

Figura 18. Caracterización fenotípica e inmunohistológica del modelo genético de melanoma con expresión de *Loxl3* (pág. 90)

Figura 19. Estudio de la aparición y crecimiento de las lesiones pigmentadas en ratones del modelo genético de melanoma en presencia o ausencia de *Loxl3* (pág. 92)

Figura 20. Estudio de la supervivencia global de los ratones del modelo genético de melanoma en presencia o ausencia de *Loxl3* (pág. 92)

Figura 21. Análisis de la diseminación metastática de las células del melanoma primario a ganglios linfáticos regionales y distales (pág. 94)

Figura 22. Análisis inmunohistológico de la diseminación metastática de las células del melanoma primario a ganglios linfáticos regionales y distales en ratones *Loxl3* WT (pág. 95)

Figura 23. Análisis de la diseminación metastática de melanomas primarios a ganglios linfáticos (pág. 96)

Figura 24. Análisis de la expresión de marcadores de linaje melanocítico en ganglios linfáticos subilíacos (pág. 97)

Figura 25. Caracterización de las lesiones pulmonares detectadas en el modelo de melanoma genético murino (pág. 99)

Figura 26. Análisis de la expresión de marcadores de plasticidad celular en melanomas primarios en función de la expresión de *Loxl3* (pág. 100)

Figura 27. Análisis de la expresión proteica de marcadores relacionados con plasticidad celular en melanoma en ganglios linfáticos subilíacos (pág. 101)

DISCUSIÓN

Figura 28. Efectos de la delección de *Loxl3* en el modelo genético murino de melanoma (pág. 119)

Abreviaturas

aa: aminoácido/s

AKT: proteína quinasa B (PKB) (*AKT serine/threonine kinase 1*)

BAPN: β-aminopropionitrilo (*β-aminopropionitrile*)

BCA: ensayo de ácido bicinconínico

BMDCs: células derivadas de la médula ósea (*bone marrow derived cells*)

BMP1: proteína morfogenética de hueso 1 (*bone morphogenetic protein 1*)

BRAF: proto-oncogén B-Raf (*B-Raf proto-oncogene*)

BSA: albúmina de suero bovino (*bovine serum albumin*)

CAFs: fibroblastos asociados al tumor

CDH1: gen que codifica E-cadherina

CDK4/CDK6: quinasa dependiente de ciclina 4/6 (*cyclin dependent kinase 4/6*)

Cdkn2a (Ink4a/Arf): inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2A (*cyclin dependent kinase inhibitor 2A*)

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario

Cre: recombinasa Cre.

CreERT²: recombinasa Cre dependiente de tamoxifeno

CRL: secuencia homóloga al receptor de citoquinas (*cytokine receptor like*)

CTCs: células circulantes de tumores (*circulating tumor cells*)

CTLA-4: proteína asociada al linfocito T-citotóxico 4 (*cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*)

DMBA: 7, 12-dimetilbenzantraceno (*7,12-Dimethyltetraphene*)

DMEM: medio esencial mínimo *Dulbecco* (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTPs: deoxiribonucleótidos trifosfato

FBS: suero fetal bovino (*fetal bovine serum*)

Flox: alelo generado tras la actuación de la Cre recombinasa sobre sitios loxP

ABREVIATURAS

Frt: secuencia reconocida por la recombinasa flipasa

Fw: secuencia en dirección 5'-3' (*forward*)

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*)

GnaqGna11: subunidad α de la proteína de unión a nucleótidos de guanina Gq/G11 (*G protein subunit alpha q/alpha 11*)

HEK: células humanas de riñón embrionario (*human embryonic kidney cells*)

HGF/SF: factor de crecimiento de hepatocitos (*hepatocyte growth factor/scatter factor*)

HIF1 α /HIF2 α : subunidad α del factor inducible por hipoxia 1/2 (*hypoxia inducible factor subunit alpha 1/2*)

HRas: oncogén Ras del virus del sarcoma de rata Harvey

HSPA5: familia A de proteínas de choque térmico miembro 5 (*heat shock protein family member 5*)

4-HT: 4-hidroxitamoxifeno

Ink4a/Arf (Cdkn2a): inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina (*cyclin dependent kinase inhibitor 2A*)

IRE1: enzima dependiente de inositol 1, activada por estrés de retículo (*inositol-requiring enzyme 1*)

KI: *knock-in*, modelo genético de ganancia de función

KO: *knock-out*, modelo genético de pérdida de función

loxP: secuencia reconocida por Cre

LOX: lisil oxidasa (*lysyl oxidase*)

LOXL1-4: proteína similar a la proteína lisil oxidasa tipo 1-4 (*Lysyl Oxidase-like 1-4*)

LTQ: lisil-tirosil-quinona

L2-KO/L3-KO: ratón doble KO para los genes *Loxl2* (L2) y *Loxl3* (L3)

MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos (*mitogen-activated protein kinase*)

MDM2: E3 ubiquitina-ligasa MDM2

MEC: matriz extracelular

MEK: proteína activada por mitógenos quinasa quinasa (*mitogen-activated protein kinase kinase*)

Melan-A: antígeno del melanoma reconocido por células T

MITF: factor de transcripción inductor de melanocitos (*melanocyte inducing transcription factor*)

MLV: virus de la leucemia de Moloney (*Moloney leukemia virus*)

mRNA: RNA mensajero

miRNA: micro RNA

MT1: metalotioneína 1 (*metallothionein 1A*)

MTT: bromuro de 3-(4 5-dimetiltiazol-2-il)-2 5-difeniltetrazolio (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

NF1: neurofibromina 1 (*neurofibromin 1*)

NLS: señal de localización nuclear (*nuclear localization signal*)

NRas: oncogén ras de neuroblastoma

NTC: oligonucleótido shRNA control no dirigido (*non-targeting control*)

p16^{Ink4}: isoforma p16 de Cdkn2a

p19^{Arf}: isoforma p19 de Cdkn2a

PACE4: proteína con actividad proteasa denominada sistema de corte de aminoácidos básico emparejado 4 (*paired basic amino acid cleaving system 4*)

PBS: tampón salino fosfato

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PD-1: proteína de muerte celular programada 1 (*programmed cell death protein 1*)

PD-L1: ligando de muerte celular programada 1 (*programmed cell death ligand 1*)

PDK1: proteína quinasa dependiente de 3-fosfoinosítido 1 (*3-phosphoinositide dependent protein kinase 1*)

PFA: paraformaldehído

PI3K: fosfatidilinositol-3 quinasa (*phosphatidylinositol 3-kinase*)

PIP2: fosfatidilinositol-(4,5)-bifosfato

PIP3: fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato

ABREVIATURAS

PP: propéptido

PRR: región rica en residuos de prolina

PS: péptido señal

PTEN: fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato 3-fosfatasa (*phosphatase and tensin homolog*)

qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real

RAF: serina/treonina proteína quinasa RAF

RAS: GTPasa RAS

Rb: proteína asociada a retinoblastoma

Ret: proto-oncogén ret

RNA: ácido ribonucleico

rpm: revoluciones por minuto

RT: transcripción reversa

RTK: receptor tirosín-quinasa

rtTA: transactivador reverso controlado por tetraciclina (*tetracycline-controlled reverse transactivator*)

Rv: secuencia en dirección 3'-5' (*reverse*)

R26: locus génico *Rosa26*

S100A1: proteína de unión a calcio A1 (*S100 calcium binding protein A1*)

SDS: dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida conteniendo dodecilsulfato sódico

sh RNA: horquilla corta de RNA (*short hairpin RNA*)

Snail1/2: represor transcripcional de la familia *Snail 1/2* (*snail family transcriptional repressor 1/2*)

SNPs: polimorfismos de un nucleótido (*single nucleotide polymorphisms*)

Sox10: factor de transcripción con caja SRY (*SRY-box transcription factor 10*).

SRCR: dominio tipo *scavenger* rico en residuos cisteína (*scavenger receptor cysteine-rich domain*)

STAT3: transductor y activador de señal de la transcripción 3 (*signal transducer and activator of transcription 3*)

SV40: virus del simio 40

TAF10: factor 10 asociado a la proteína de unión a la caja TATA (*TATA-box binding protein associated factor 10*)

TBS: tampón salino tris

TCF3: factor de transcripción 3 (*transcription factor 3*)

TCGA: atlas del genoma del cáncer (*The Cancer Genome Atlas*)

TEM: transición epitelio-mesénquima

TEM-FTs: factores de transcripción asociados a la TEM

Tg: transgénico

TGF- β : factor de crecimiento transformante β (*transforming growth factor β*)

TNF α : factor de necrosis tumoral α (*tumor necrosis factor α*)

TPA: tetradecanoilforbol-13-acetato (*tetradecanoylphorbol-13-acetate*)

TTBS: tampón salino tris conteniendo *tween*

Twist1: factor de transcripción de la familia bHLH 1 (*twist family bHLH transcription factor 1*)

Tyr: tirosinasa (*tyrosinase*)

TYRP2: proteína relacionada con la tirosinasa 2 (*tyrosine-related protein 2*)

UVA/B: radiación ultravioleta A/B

WT: alelo/fenotipo silvestre (*wild type allele/phenotype*)

XBP1: proteína de unión a la caja X 1 (*X-box binding protein 1*)

Zeb1: *zinc finger E-box binding homeobox 1*

Zeb2: *zinc finger E-box binding homeobox 2*



INTRODUCCIÓN

Introducción

1. La familia de proteínas lisil oxidasa

1.1. Integrantes, estructura y función canónica

Los miembros de la familia lisil oxidasa se describieron inicialmente como proteínas secretadas con actividad enzimática de desaminación oxidativa sobre residuos de lisina, en particular de moléculas colágeno y elastina, generando entrecruzamientos postraduccionales (Csiszar, 2001). La familia de proteínas lisil oxidasa está formada por cinco miembros: la proteína lisil oxidasa prototípica (LOX) y 4 miembros lisil oxidasa-*like* 1 a 4 (LOXL1-4) (Fig. 1) (Csiszar, 2001, Kagan and Li, 2003).

En cuanto a su estructura, la región C-terminal de todos los miembros de la familia está muy conservada y contiene el dominio catalítico. El centro catalítico consta de tres residuos de histidina conservados (H292, H294 y H296 en LOX, Fig. 1) encargados de coordinar un átomo de Cu^{2+} , uno de los cofactores esenciales para la actividad catalítica junto con el cofactor unido covalentemente lisil-tirosil-quinona (LTQ) (Lucero and Kagan, 2006) (Fig. 1). Además, el dominio C-terminal incluye un dominio receptor de tipo citoquina (CRL) que se cree que contribuye a la formación del sitio activo (Csiszar, 2001), aunque su función específica no está todavía establecida.

Las proteínas de la familia lisil oxidasa difieren en su extremo N-terminal. Todos los miembros de la familia contienen en este extremo un péptido señal (PS) (Fig. 1). LOX y LOXL1, tras su secreción, son procesadas proteolíticamente perdiendo la secuencia propéptido (PP) y generando una forma activa de 32 kDa en el caso de LOX o perdiendo la región rica en residuos de prolina (PRR) en el caso de LOXL1 (Fig. 1) (Borel et al., 2001, Uzel et al., 2001, Kagan and Li, 2003). LOXL2, LOXL3 y LOXL4 contienen en el extremo amino cuatro dominios de tipo *scavenger* ricos en residuos de cisteína (SRCR) altamente conservados e implicados probablemente en interacciones proteína-proteína (Fig. 1) (Sarrias et al., 2004, Lucero and Kagan, 2006, Grau-Bove et al., 2015). La función de los dominios SRCR no ha sido esclarecida, si bien algunos autores han descrito que los dominios SRCR de LOXL3 presentan actividad deacetilasa (Ma et al., 2017). Por otro lado, LOXL3 es el

INTRODUCCIÓN

único miembro de la familia lisil oxidasa con una señal de localización nuclear (NLS) situada entre los dominios SRCR2 y SRCR3 (Fig. 1).

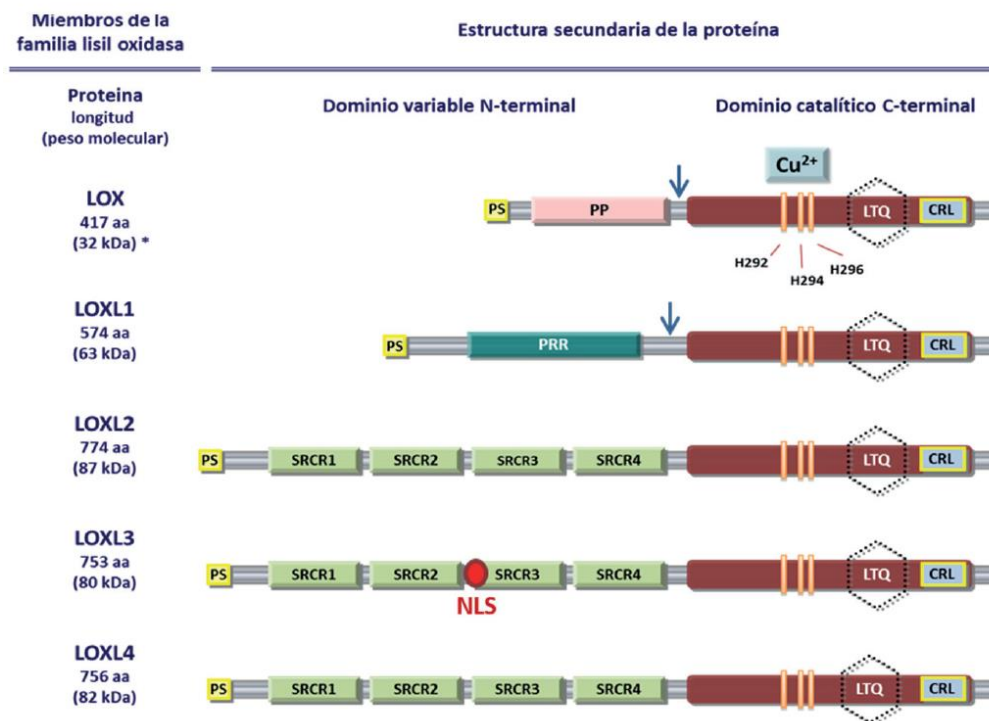


Figura 1. Representación esquemática de los integrantes de la familia lisil oxidasa y de sus dominios estructurales. Todos los miembros tienen homología en el extremo carboxilo terminal, donde se encuentra el dominio catalítico (granate) mientras que difieren en el extremo amino terminal. CRL: receptor de tipo citoquina; Cu²⁺: átomo de cobre coordinado por tres residuos de histidina (se indican sus posiciones en la proteína LOX); LTQ: cofactor lisil-tirosil-quinona; NLS: señal de localización nuclear; PP: propéptido; PRR: región rica en residuos de prolina; PS: péptido señal; SRCR: dominios tipo *scavenger* ricos en cisteína. Se muestran con flechas el lugar de procesamiento proteolítico en LOX y LOXL1. Adaptado de (Cano et al., 2012).

La función clásica de los miembros de la familia lisil oxidasa está asociada a la remodelación de la matriz extracelular (MEC) a través de la generación de entrecruzamientos tanto intra como intermoleculares en moléculas de colágeno y elastina (Reiser et al., 1992), generando fibras maduras y resistentes responsables de las propiedades mecánicas de la MEC (Csiszar, 2001). Las proteínas lisil oxidasas catalizan la desaminación oxidativa del grupo ε-amino de residuos de lisina o hidroxilisina localizados en los extremos amino y carboxilo terminal de las formas inmaduras del colágeno y la elastina (Fig. 2). El cofactor LTQ actúa como aceptor de los electrones del proceso oxidativo

liberándose una molécula de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El aldehído resultante (alisina) reacciona espontáneamente con otro residuo de lisina o hidroxilisina (desaminadas o no) en una reacción de condensación produciéndose el entrecruzamiento de las fibras (Fig. 2) (Kagan and Li, 2003, Lucero and Kagan, 2006).

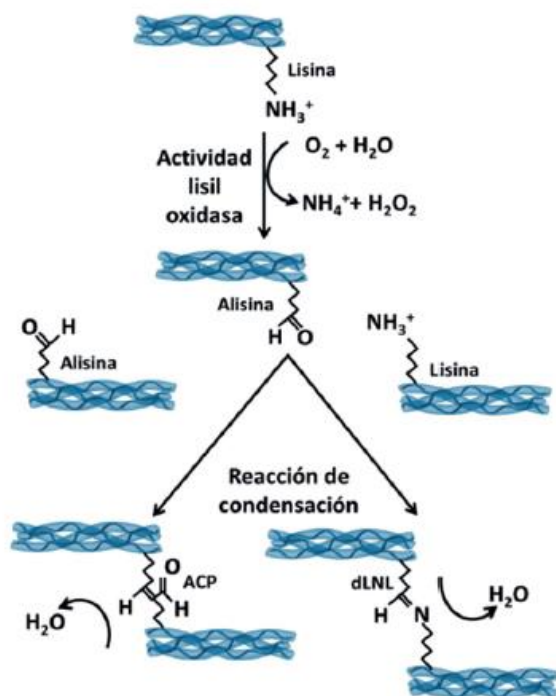


Figura 2. Esquema de la reacción catalizada por la actividad lisil oxidasa entre moléculas de colágeno. Un residuo de lisina del extremo de una molécula de colágeno es desaminado oxidativamente por una proteína lisil oxidasa. En la reacción se libera un grupo amonio y una molécula de H_2O_2 generándose un grupo aldehído (alisina). En una segunda reacción, el aldehído resultante puede reaccionar con otra lisina desaminada (alisina) o condensarse con un residuo de lisina sin modificar formando un entrecruzamiento de tipo anhidro-lisino-norleucina liberándose en ambas reacciones una molécula de H_2O . Tomado de (Salvador, 2014).

La actividad catalítica clásica de los miembros de la familia LOX puede ser inhibida irreversiblemente por β -aminopropionitrilo (BAPN) mediante su unión covalente al dominio catalítico (Pinnell and Martin, 1968, Kagan and Li, 2003). De hecho, el inhibidor BAPN inhibe exclusivamente a los miembros de la familia LOX, a diferencia de otras amino oxidasas asociadas a tejido y presentes en el suero que no se ven afectadas por BAPN o que son capaces de oxidar el BAPN como sustrato de su actividad enzimática (Trackman, 2016a). No obstante, los datos con respecto a la inhibición mediada por BAPN de los distintos miembros LOX son en ocasiones contradictorios en función de la metodología utilizada en los ensayos bioquímicos por lo que la especificidad de su actividad sigue siendo discutida (Hajdu et al., 2018).

1.2. Regulación de la expresión de los genes *LOX* y sus distintas isoformas

Se desconoce en gran medida la regulación de la expresión de los genes de la familia *LOX*. El mecanismo más conocido es la inducción de la expresión mediada por hipoxia, en particular de *LOX*, *LOXL2* y *LOXL4* (Erler et al., 2006, Bignon et al., 2011, Wong et al., 2011). De hecho, los factores de transcripción regulados por hipoxia HIF-1 α o HIF-2 α , se unen a los promotores de los genes *LOX* y *LOXL2* induciendo su expresión (Schietke et al., 2010, Wang et al., 2017). En el caso de *LOXL2* también se ha descrito una regulación transcripcional mediada por TGF β regulada por la unión de Smad4 a su promotor, así como su regulación a través de miRNAs en células de hepatocarcinoma (Wong et al., 2014).

Asimismo se han descrito varios mecanismos de regulación postranscripcional mediante *splicing* alternativo. Así, se han descrito variantes de *splicing* para varios miembros de la familia lisil oxidasa (*LOXL2*, *LOXL3* y *LOXL4*, cuyos genes contienen 14 exones, salvo *LOXL4* que tiene 17), algunas de ellas con funciones distintas e incluso opuestas a las de la isoforma canónica respectiva. Es el caso de *LOXL4*, para la que se han descrito dos variantes de *splicing* que carecen del exón 9 (*LOXL4* Δ E9) o de los exones 8 y 9 (*LOXL4* Δ E8E9). Estas variantes han sido detectadas principalmente en muestras obtenidas de efusiones de pacientes con cáncer de ovario o mama y se les han atribuido funciones oncogénicas frente a la proteína *LOXL4* silvestre, la cual podría actuar como supresor tumoral (Sebban et al., 2009, Sebban et al., 2013). En el caso de *LOXL2*, se ha descrito una variante de *splicing* que carece del exón 13 (*LOXL2* Δ E13) que promueve la motilidad celular y la invasión en carcinomas esofágicos de células escamosas aunque presenta solo un 30% de actividad catalítica (Lv et al., 2014, Zhan et al., 2019).

Respecto a *LOXL3*, se han descrito hasta la fecha tres variantes de *splicing*: una isoforma que carece de los exones 5 y 8 (*LOXL3* Δ E5E8) expresada en placenta y piel y detectada mediante análisis informático de marcadores de secuencias expresadas aunque no a nivel de mRNA o de proteína (Jourdan-Le Saux et al., 2001); otra variante que carece de los exones 1, 2, 3 y 5 (*LOXL3* Δ E1E2E3E5) que se detectó en citoplasma y medio extracelular y en diferentes tejidos a nivel de proteína y mRNA y que presenta actividad amino oxidasa sobre colágeno y elastina (Lee and Kim, 2006); y, por último, se ha descrito

una isoforma que carece de los exones 4 y 5 (LOXL3 $\Delta E4E5$) con actividad amino oxidasa frente a colágeno de tipo I, detectada mediante RT-PCR en diferentes tejidos (Jeong and Kim, 2017) y a nivel de proteína en numerosas líneas celulares de melanoma primario y metastático (Floristán, 2015, Santamaría et al., 2018).

1.3. Regulación postraduccional de los miembros de la familia LOX, secreción y localización intracelular

Respecto a las modificaciones postraduccionales de la familia LOX, se sabe que la N-glicosilación está implicada en la secreción, localización y función de algunos de sus integrantes. El precursor proLOX de la proteína LOX prototípica es glicosilado en el extremo N-terminal antes de ser procesado (Trackman et al., 1992), si bien esta modificación no es necesaria para la secreción de la proteína pero sí para que la enzima tenga una actividad óptima (Grimsby et al., 2010). En relación a LOXL2 se ha descrito, en células de cáncer de mama, que la forma secretada está N-glicosilada en dos residuos de asparagina (N455, N644) a diferencia de la forma intracelular que no lo está, siendo estas modificaciones esenciales para su secreción (Rebecchi et al., 2011, Moon et al., 2013, Xu et al., 2013).

Todas las proteínas de la familia LOX pueden ser secretadas al medio extracelular. LOX y LOXL1 son secretadas como proproteínas (proLOX y proLOXL1, respectivamente) y son procesadas proteolíticamente por la proteasa BMP1 (*bone morphogenetic protein 1*) liberándose el extremo N-terminal y adquiriendo la capacidad catalítica (Cronshaw et al., 1995, Panchenko et al., 1996, Csiszar, 2001, Borel et al., 2001, Kagan and Li, 2003). Además, se ha descrito que LOXL2 es secretada y puede ser procesada extracelularmente, aparentemente por la proteasa PACE4 (*paired basic amino acid cleaving system 4*), generando una forma activa que carece de los dos primeros dominios SRCR y que tiene como sustrato el colágeno tipo IV, mientras que la forma silvestre (isoforma completa) secretada y no procesada presenta actividad amino oxidasa frente a sustratos solubles (Lopez-Jimenez et al., 2017, Okada et al., 2018).

Además de su localización en el medio extracelular, la mayoría de los miembros de la familia LOX han sido detectados en diferentes compartimentos celulares, lo que sugiere funciones adicionales para estas proteínas. La proteína LOX madura puede traslocarse al núcleo, independientemente de su actividad catalítica, en células de músculo liso vascular y fibroblastos (Li et al., 1997, Nellaiappan et al., 2000). Además, LOX se localiza en el citoplasma de algunas células epiteliales polarizadas (Jansen and Csiszar, 2007). LOX y LOXL1 también se han encontrado en el núcleo celular en distintos tejidos embrionarios y adultos de ratón (Hayashi et al., 2004). LOXL2 ha sido detectada en citoplasma, núcleo y en la región perinuclear en células en cultivo y en tejidos tumorales (Peinado et al., 2005, Peinado et al., 2008, Moreno-Bueno et al., 2011, Cano et al., 2012, Cuevas et al., 2014). Los mecanismos responsables de la localización intracelular de las diferentes proteínas LOX no se han dilucidado todavía, si bien en el caso de LOXL2 se ha propuesto la existencia de un receptor encargado de su internalización, específicamente en queratinocitos (Lugassy et al., 2012).

Respecto a LOXL3, presenta cinco sitios teóricos de N-glicosilación (Asn 111, 266, 390, 481 y 625) y se ha descrito que la N-glicosilación es necesaria para su secreción (Floristán, 2015). Posee además tres sitios putativos de O-glicosilación que no están presentes en otros miembros de la familia y cuya funcionalidad aún no se ha establecido (Laurentino et al., 2019). También se ha mostrado su localización en citoplasma, núcleo y en la región perinuclear en distintas líneas celulares (Peinado et al., 2005, Ma et al., 2017, Santamaría et al., 2018), si bien no se ha determinado si la secuencia NLS presente en LOXL3 (Fig. 1) es necesaria para su localización nuclear.

1.4. Función fisiológica de las proteínas lisil oxidasa

1.4.1. Modelos genéticos de ratón de los miembros de la familia LOX

El desarrollo de diferentes modelos genéticos, fundamentalmente murinos, de pérdida o ganancia de función de los distintos miembros de la familia LOX ha contribuido a esclarecer su función fisiológica (Tabla 1).

La delección de *Lox* en ratón genera letalidad perinatal provocada por aneurismas aórticos, disfunción cardiovascular y ruptura diafragmática. La pared de la aorta de los ratones KO (*knock-out*) de *Lox* es más delgada y las fibras elásticas de las capas de células musculares lisas están fragmentadas y presentan una disposición discontinua (Maki et al., 2002, Hornstra et al., 2003). La expresión de *Lox* es también esencial para el mantenimiento de la integridad de las fibras de colágeno y elastina del pulmón y de la piel (Maki et al., 2005).

La pérdida de expresión de *Lox/1* no afecta a la viabilidad de los ratones, aunque compromete la correcta deposición de las fibras de elastina en el útero, pulmón, piel y aorta, generando en las hembras, entre otras alteraciones, prolapso pélvico tras varios partos (Liu et al., 2004).

Tabla 1. Modelos genéticos de ratón de las proteínas lisil oxidasas.

Proteína	Tipo de modelo genético*	Función/fenotipo	Referencia
Lox	Ratón KO	Alteración en el desarrollo y función de los sistemas cardiovascular y respiratorio; letalidad perinatal	(Maki et al., 2002, Hornstra et al., 2003)
Lox	Ratón KI	Función crítica en el remodelado vascular	(Orriols et al., 2014)
Loxl1	Ratón KO	Prolapso pélvico y anomalías esqueléticas ligadas al género	(Liu et al., 2004, Alsofi et al., 2016)
Loxl2	Ratón KO	Defectos congénitos en corazón, distensión de capilares hepáticos; letalidad perinatal de penetrancia incompleta	(Martin et al., 2015)
	Ratón KO condicional (adulto)	Fibrosis cardiaca inducida por estrés, aumento del daño cardíaco	(Yang et al., 2016)
Loxl2	Ratón KI	Esterilidad en machos	(Martin et al., 2015)
Loxl3	Ratón KO	Función primaria durante el desarrollo del esqueleto, músculo y pulmón; letalidad perinatal de penetrancia incompleta	(Zhang et al., 2015, Floristán, 2015, Zhang et al., 2016, Kraft-Sheleg et al., 2016)
Loxl4	-	No existe ningún modelo genético descrito hasta la fecha	-

*Los modelos genéticos son constitutivos si no se indica lo contrario. KO: *knock-out*; KI: *knock-in*

El ratón con delección constitutiva de *Lox/2* (*L2-KO*), generado en nuestro laboratorio en un fondo genético mixto, presenta muerte perinatal con penetrancia incompleta (Salvador, 2014, Martin et al., 2015). En algunos animales *L2-KO* a día 1 postnatal (P1) se encontraron defectos graves en el corazón, con formación incompleta de los septos ventriculares, lo que daría lugar a un flujo de la sangre aberrante responsable de la letalidad. Además, algunos animales *L2-KO* presentan distensión de los vasos hepáticos (Martin et al., 2015). También se ha generado en nuestro laboratorio un modelo de sobreexpresión constitutiva de *Lox/2* (*L2-KI*, *knock-in*), el cual presenta esterilidad en los machos debida a hipertrofia del epidídimo, asociada a fibrosis e inflamación (Martin et al., 2015).

Respecto a *Lox/3*, en nuestro grupo se generó un modelo genético de delección de *Lox/3* (*L3-KO*), que presenta letalidad perinatal con penetrancia incompleta. Los ratones adultos que carecen de *Lox/3* presentan menor tamaño, alteraciones locomotrices y menor supervivencia que los ratones control (Floristán, 2015). El análisis de este modelo genético determinó que, durante el desarrollo embrionario, *Lox/3* se expresa en estructuras cartilaginosas pre-óseas y la letalidad asociada a los animales *L3-KO* se debe, en parte, a defectos en procesos de osificación endocondral (Floristán, 2015). Otros autores han descrito que la delección constitutiva de *Lox/3* causa deformidad espinal provocada por anomalías en los primordios del cartílago de las vértebras torácicas así como paladar hendido (Zhang et al., 2015). Además, estos ratones muestran volúmenes y pesos pulmonares reducidos, espacios saculares disminuidos y cavidades torácicas deformadas y más pequeñas durante el desarrollo embrionario (Zhang et al., 2016). Asimismo, se ha descrito que la pérdida de *Lox/3* ocasiona defectos musculares al afectar al anclaje de las miofibras o su localización intrasomitos (se anclan prematuramente o sobrepasan las somitas adyacentes) lo que resulta en la falta de tensión de las mismas durante el desarrollo embrionario (Kraft-Sheleg et al., 2016).

Además de los modelos genéticos murinos mencionados, se han generado modelos genéticos en pez cebra para *Lox/2* y *Lox/3*. En el modelo de pez cebra KO para *Lox/2* se observa un defecto circulatorio entre los vasos intersegmentarios del embrión (24 y 48 h después de la fertilización), demostrando la participación de *Lox/2* en la correcta formación

del sistema vascular afectando a la ramificación de los capilares (*sprouting*) (Bignon et al., 2011). Respecto a Loxl3, modelos de delección con morfolinós en pez cebra muestran su implicación en la condrogénesis durante el desarrollo del cartílago craneofacial (van Bortel et al., 2011).

1.4.2. Estudios de la función de los miembros de la familia LOX en sistemas *in vitro*

Existen numerosos estudios que describen las distintas funciones fisiológicas de los miembros de la familia LOX en sistemas *in vitro*. A continuación se describen algunos estudios representativos en los que se determinaron sus funciones más relevantes. Estudios en modelos *in vitro* han implicado a LOX en varios procesos intracelulares como la transcripción génica (Giampuzzi et al., 2000), la remodelación de la cromatina (Kagan et al., 1983, Giampuzzi et al., 2003), la quimiotaxis dependiente de H₂O₂ producida en la catálisis extracelular (Li et al., 2000) o la diferenciación de algunos tipos celulares como osteoblastos y adipocitos (Pischon et al., 2009, Huang et al., 2009).

Por otro lado, nuestro grupo describió que la proteína LOXL2, y en menor medida LOXL3, inducen el proceso de transición epitelio-mesénquima (TEM) en la línea celular MDCK, mediante la estabilización postraducciona del factor de transcripción de TEM (TEM-FT) Snail1 (Peinado et al., 2005). Snail1 regula negativamente la expresión del gen de E-cadherina, esencial en la adhesión intercelular (Cano et al., 2000, Batlle et al., 2000) como se detallará más adelante. Otros autores han descrito que la actividad enzimática amino oxidasa de LOXL2 es responsable de su función epigenética, al oxidar y demetilar el residuo K4 de la histona H3, colaborando mediante este mecanismo con Snail1 en la represión transcripcional (Millanes-Romero et al., 2013) y compactación de la cromatina (Cebria-Costa et al., 2019), y oxidando TAF10, un factor de transcripción involucrado en diferenciación neuronal (Iturbide et al., 2015). Sin embargo, estudios de nuestro laboratorio indican que la inducción de TEM mediada por LOXL2 es independiente de su actividad oxidasa (Lugassy et al., 2012, Cuevas et al., 2014, Canesin et al., 2015), y que la sobreexpresión de LOXL2 promueve su acumulación en el retículo endoplásmico, donde

interacciona con HSPA5 (*heat shock protein family A member 5*) favoreciendo la activación de la ruta IRE1-XBP1 de respuesta a estrés de retículo y la expresión de varios TEM-FTs, dianas transcripcionales directas de XBP1 (Cuevas et al., 2017).

Existe un menor número de estudios *in vitro* analizando la función de LOXL1, LOXL3 y LOXL4, al margen de su actividad catalítica clásica. Así, estudios realizados en líneas celulares han mostrado que LOXL3 es capaz de regular la actividad del factor de transcripción STAT3, mediante su deacetilación y deacetiliminación en el núcleo, impidiendo su dimerización y por tanto su actividad transcripcional (Ma et al., 2017). Por otra parte, los estudios de nuestro grupo mostraron la participación de LOXL3 en la respuesta del daño al DNA y en su reparación por recombinación homóloga en células de melanoma (Santamaría et al., 2018).

1.5. Implicación de los miembros de la familia LOX en patologías humanas no tumorales

El amplio patrón de expresión de los miembros de la familia LOX junto con su importante función en el mantenimiento de la homeostasis de la MEC hace que alteraciones en su expresión y/o función estén relacionadas con diversas enfermedades (Tabla 2). Así, una reducción de la actividad de LOX ha sido detectada en varias patologías humanas hereditarias como la enfermedad de Menkes, el síndrome del cuerno occipital o el síndrome de Ehlers Danlos (Royce et al., 1980, Kuivaniemi et al., 1985, Maki, 2009), enfermedades causadas por mutaciones que afectan a las proteínas encargadas en controlar la disponibilidad de cobre y que, por tanto, merman la actividad catalítica mediada por la familia LOX. Otras enfermedades relacionadas con bajos niveles de expresión y/o actividad catalítica de la proteína LOX prototípica son la cutis laxa congénita (Khakoo et al., 1997) y la predisposición a aneurismas arteriales (Sibon et al., 2005, Rodriguez et al., 2008, Remus et al., 2012). En el caso de LOXL1, se ha descrito una baja expresión de la proteína LOXL1 en modelos animales y pacientes con prolapso pélvico orgánico (Lee et al., 2008, Zhou et al., 2013) (Tabla 2), en consonancia con el fenotipo observado en ratones KO para *Loxl1* (Tabla 1).

Por otro lado, el exceso de actividad lisil oxidasa también se ha relacionado con diferentes enfermedades humanas. Varios estudios indican que LOX se sobreexpresa en procesos fibróticos en hígado, corazón, pulmón, arterias, dermis y riñón (Tabla 2). En cuanto a enfermedades que afectan al sistema nervioso central, se ha observado que LOX se sobreexpresa en un modelo murino de esclerosis lateral amiotrófica (Li et al., 2004) y en cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer (Gilad et al., 2005) (Tabla 2).

Asimismo, se ha observado elevada expresión y actividad de LOXL2 en fibrosis intersticial y fibrosis atrial en corazón (Yang et al., 2016, Zhao et al., 2017), fibrosis tubulointersticial en modelos murinos de fibrosis renal (Choi et al., 2017, Cosgrove et al., 2018), enfermedad de Wilson y cirrosis biliar primaria hepática (Vadasz et al., 2005), así como en fibroblastos en sistemas celulares de fibrosis pulmonar y fibrosis pulmonar idiopática donde también otros miembros de la familia como LOX y LOXL3 presentan una función destacada (Aumiller et al., 2017) (Tabla 2).

La participación de LOXL2 en las citadas patologías se ha demostrado en estudios *in vivo* en los que anticuerpos específicos desarrollados frente a LOXL2 reducen significativamente procesos de fibrosis hepática y pulmonar en modelos murinos donde la fibrosis es inducida por agentes químicos (Rodriguez et al., 2010, Barry-Hamilton et al., 2010). Sin embargo, un anticuerpo monoclonal humanizado que reconoce e inhibe LOXL2 (Simtuzumab), a pesar de ser clínicamente tolerado sin efectos adversos graves (Meissner et al., 2016), no proporciona beneficio clínico ni disminuye la fibrosis en pacientes con mielofibrosis (Verstovsek et al., 2016), ni es capaz de mejorar el tiempo libre de progresión en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (Raghu et al., 2017), ni tampoco disminuye el contenido de colágeno hepático en ensayos clínicos con pacientes con fibrosis provocada por esteatohepatitis no alcohólica (Harrison et al., 2018) o colestasis esclerosante primaria (Fickert, 2019).

En cuanto a LOXL3, el aumento de su expresión en cartílago se ha relacionado con la patogénesis en osteoartritis (Huang et al., 2016), además de su implicación en fibrosis pulmonar idiopática (Tabla 2) (Aumiller et al., 2017).

Tabla 2. Patologías no tumorales relacionadas con las proteínas lisil oxidasas.

Proteína	Alteración asociada	Patología	Referencia
LOX	Baja actividad catalítica o bajos niveles de expresión	Enfermedad de Menkes, síndrome del cuerno occipital, síndrome de Ehlers Danlos, cutis laxa, aneurismas arteriales	(Royce et al., 1980, Kuivaniemi et al., 1985, Khakoo et al., 1997, Sibon et al., 2005, Rodriguez et al., 2008, Maki, 2009, Remus et al., 2012)
LOX	Alta actividad catalítica o elevados niveles de expresión	Procesos fibróticos, enfermedad de Wilson, cirrosis biliar hepática, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer	(Siegel et al., 1978, Kagan, 1994, Smith-Mungo and Kagan, 1998, Li et al., 2004, Gilad et al., 2005, Vadasz et al., 2005, Maki, 2009, Voloshenyuk et al., 2011, Aumiller et al., 2017)
LOX	Mutaciones	Aneurismas aórticos	(Guo et al., 2016, Lee et al., 2016)
LOXL1	SNPs, mutaciones, o bajos niveles de expresión	Glaucoma de exfoliación, prolapso pélvico, problemas elásticos sistémicos	(Thorleifsson et al., 2007, Ritch, 2008, Lee et al., 2008, Tarkkanen, 2008, Zhou et al., 2013)
LOXL2	Alta actividad catalítica o elevados niveles de expresión	Procesos fibróticos, enfermedad de Wilson, cirrosis biliar hepática	(Vadasz et al., 2005, Maki, 2009, Yang et al., 2016, Aumiller et al., 2017, Zhao et al., 2017, Choi et al., 2017, Cosgrove et al., 2018)
LOXL2	Mutaciones o hipermetilación	Elastolisis dérmica, aneurisma intracraneal familiar	(Gambichler et al., 2016, Wu et al., 2018)
LOXL3	Mutaciones	Síndrome de Stickler, alta miopía, paladar hendido no sindrómico	(Alzahrani et al., 2015, Li et al., 2016, Khan et al., 2018, Chan et al., 2019)
LOXL3	Alta actividad catalítica o elevados niveles de expresión	Osteoartritis, fibrosis pulmonar idiopática	(Huang et al., 2016, Li et al., 2016, Aumiller et al., 2017)

En relación a la presencia de mutaciones o polimorfismos en genes de la familia LOX, se han descrito mutaciones en el gen *LOX* que predisponen a padecer aneurismas aórticos torácicos (Guo et al., 2016, Lee et al., 2016). También, polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) no sinónimos en el gen de *LOXL1* se han asociado al síndrome exfoliativo (Thorleifsson et al., 2007) y, recientemente, se ha descrito una variante génica de *LOXL1* que confiere protección frente a este síndrome responsable del glaucoma exfoliativo (Aung et al., 2017). También se ha descrito la mutación C133T en *LOXL2* como patogénica y responsable de un porcentaje de casos de aneurisma intracraneal familiar (Wu et al., 2018).

Adicionalmente, la disminución de la expresión de *LOXL2* debida a la presencia de mutaciones o hipermetilación de su promotor también se ha asociado a la elastosis dérmica (Gambichler and Skrygan, 2013, Gambichler et al., 2016, Gambichler et al., 2019). (Tabla 2).

Respecto a *LOXL3*, se han descrito dos mutaciones homocigotas (c.2027G>A, C676Y; c.1036C>T, R346W) asociadas al síndrome de Stickler diagnosticado en dos familias no relacionadas (Alzahrani et al., 2015, Chan et al., 2019). El síndrome de Stickler es una colagenopatía caracterizada por la artropatía y vitreorretinopatía con alta miopía y paladar hendido como características comunes, normalmente causada por mutaciones en genes de los colágenos presentes en cartílago (Snead and Yates, 1999). Además, se ha identificado una mutación nula en homocigosis (c.39dup, p.L14A fs*21) en *LOXL3* y esta misma en combinación con otra mutación de cambio de pauta de lectura (c.594delG, p.Q199K fs*35), relacionadas con la aparición temprana de miopía (Li et al., 2016). También se ha identificado una mutación con cambio de sentido (c.1843A>T, I615F) asociada a la presencia de paladar hendido no sindrómico, debido a la ausencia de actividad catalítica de *LOXL3* (Khan et al., 2018) (Tabla 2).

En definitiva, la alteración de la expresión y/o función de los distintos miembros de la familia LOX en patologías no tumorales está asociada fundamentalmente a su función catalítica involucrada en la homeostasis de la matriz extracelular.

1.6. Implicación de los miembros de la familia LOX en cáncer

1.6.1. TEM y el proceso de metástasis

La metástasis es responsable del 90% de las muertes causadas por tumores en humanos. La metástasis es un proceso complejo y multisecuencial iniciado por un grupo de células del tumor primario que adquieren una serie de propiedades que les permiten diseminarse y colonizar órganos distantes (Gupta and Massague, 2006, Valastyan and Weinberg, 2011). Uno de los primeros eventos del proceso metastático en carcinomas es la invasión local de las células tumorales a tejidos adyacentes, como etapa previa a su

diseminación por el torrente circulatorio. Durante la invasión local, las células tumorales sufren una serie de cambios que afectan a los mecanismos de adhesión célula-célula, provocados por la reducción de la expresión y/o función de la proteína E-cadherina, y a los de adhesión célula-MEC. Asimismo, las células adquieren habilidades migratorias y capacidad para degradar la MEC que rodea al tumor primario. Todos estos cambios se asocian a la pérdida total o parcial de la morfología epitelial que se da durante el proceso de TEM. La TEM es un programa biológico esencial durante el desarrollo embrionario temprano responsable del establecimiento de estructuras embrionarias clave como son las derivadas de la cresta neural (Thiery et al., 2009). A partir de la identificación del factor de transcripción Snail (Snail1) como represor de E-cadherina e inductor de la TEM (Cano et al., 2000, Batlle et al., 2000), se identificaron otros factores de transcripción represores de E-cadherina e inductores de TEM (denominados conjuntamente TEM-FTs) como son Slug (Snail2), los dos miembros de la familia Zeb (Zeb1 y Zeb2), y varios miembros de la familia bHLH, como son Twist1 o E47/TCF3, considerados junto con Snail1 los TEM-FTs clásicos (Peinado et al., 2007, Nieto and Cano, 2012, Lamouille et al., 2014). Asimismo, se han identificado otros factores que también actúan como inductores de TEM, como son FOXC2, Goosecoid, KLF8, o E2-2/TF4 (Thiery et al., 2009, Polyak and Weinberg, 2009, Nieto and Cano, 2012, Nieto et al., 2016).

1.6.2. Implicación de los miembros de la familia LOX en la progresión tumoral

Aunque inicialmente la proteína LOX fue propuesta como supresor tumoral (Contente et al., 1990, Kenyon et al., 1991, Giampuzzi et al., 2001), al igual que LOXL4 (Sebban et al., 2013), la evidencia acumulada hasta el momento respalda que las proteínas lisil oxidasas, y en particular LOX y LOXL2, favorecen la progresión del cáncer, especialmente la metástasis (Cano et al., 2012, Barker et al., 2012, Wang et al., 2016, Trackman, 2016b).

La tensión o rigidez de la MEC que rodea a los tumores es una característica relevante del microambiente tumoral, afectando a la capacidad invasiva y a la migración de las células tumorales (Taddei et al., 2013, Handorf et al., 2015, Kai et al., 2019). En principio, la función catalítica extracelular de las lisil oxidasas sobre el colágeno promovería MECs más

rígidas (Kai et al., 2019). De hecho, se ha descrito que la acción de LOX sobre la MEC en tumores de mama promueve un mayor entrecruzamiento de las fibras de colágeno, lo que aumenta la rigidez tumoral promoviendo las adhesiones focales, mediadas por integrinas, aumentando la actividad de la fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K) y favoreciendo el comportamiento invasivo y metastático de las lesiones tumorales (Levental et al., 2009). Numerosos estudios han sugerido la contribución de las proteínas LOX a la metástasis de los tumores de mama a través de la remodelación de la MEC (Akiri et al., 2003, Barry-Hamilton et al., 2010, Barker et al., 2011, Barker et al., 2013), promoviendo la formación de fibrillas de colágeno lineales y rígidas que favorecerían la migración e invasión de las células tumorales, así como la activación de fibroblastos asociados al tumor (CAFs) (Barry-Hamilton et al., 2010, Barker et al., 2013, Kai et al., 2019). Sin embargo, datos de nuestro grupo han puesto de manifiesto que, al menos LOXL2, favorece la metástasis pulmonar en modelos murinos de cáncer de mama independientemente de la rigidez de la MEC del tumor primario (Salvador et al., 2017).

Además de las acciones sobre el tumor primario, algunos miembros de la familia LOX también han sido implicados en el condicionamiento de los órganos secundarios a través de diferentes mecanismos. El tumor primario libera al torrente sanguíneo células tumorales, de las que sólo algunas son capaces de extravasarse y anidar en un tejido distante (micrometástasis), y muy pocas de éstas llegan a expandirse hasta formar una lesión secundaria clínicamente detectable (macrometástasis) (Valastyan and Weinberg, 2011). Se ha descrito que algunos tipos de tumores son capaces de generar un microentorno receptivo en el órgano diana para futuras colonizaciones metastáticas, mediante un proceso conocido como formación del “nicho premetastático” (Kaplan et al., 2005, Sceneay et al., 2013). Numerosos factores solubles y exosomas secretados por el tumor primario son los encargados de condicionar ciertos tejidos y crear un microambiente favorable a la recepción de las células tumorales (Psaila and Lyden, 2009, Peinado et al., 2011, Sceneay et al., 2013, Peinado et al., 2017). A su vez, ciertos factores solubles permiten movilizar y atraer al órgano diana a células derivadas de la médula ósea (BMDCs: *Bone Marrow Derived Cells*) que facilitan la adhesión y anidamiento de las células tumorales

(Kaplan et al., 2005, Peinado et al., 2012). Entre los factores secretados por el tumor primario se encuentran algunos miembros de la familia lisil oxidasa. Así, LOX es secretada por tumores en respuesta a hipoxia y se acumula en lugares de futuras metástasis, como el pulmón, donde su acción sobre el colágeno de la membrana basal es clave para el reclutamiento de BMDCs (Erler et al., 2009, Wong et al., 2011, Cox et al., 2013). Asimismo, en las metástasis óseas, LOX desregula la homeostasis del tejido óseo en favor de la osteoclastogénesis, causando lesiones osteolíticas que actúan como nicho premetastático (Cox et al., 2015). También se ha descrito la participación de LOX, LOXL2 y LOXL4 en la generación del nicho premetastático pulmonar en tumores de mama, favoreciendo la movilización de BMDCs y la expresión de diversas citoquinas (Wong et al., 2011, Canesin et al., 2015). LOXL2 contribuye igualmente a la formación del nicho premetastático y promueve la invasión y la metástasis en carcinoma hepatocelular (Wong et al., 2014), funciones estas últimas descritas también para LOXL4 mediante su secreción en exosomas (Li et al., 2019).

Además de la participación de los miembros de la familia LOX en la remodelación de la MEC del tumor primario y en la generación del nicho premetastático, algunas proteínas LOX promueven la tumorigénesis y la metástasis mediante funciones intracelulares. Estas acciones estarían mediadas en parte por la asociación de algunas proteínas LOX con la regulación de la TEM. En particular, como se ha comentado previamente, LOXL2 induce la TEM mediante la regulación de la estabilidad del Snail1 (Peinado et al., 2005) y la expresión de otros TEM-FTs a través del factor de transcripción activado por estrés de retículo XBP1 (Cuevas et al., 2017). Asimismo, se ha descrito que la participación del eje LOXL2-Snail1 en la represión de la transcripción de regiones satélites de la heterocromatina centromérica favorece el proceso de TEM (Millanes-Romero et al., 2013). Adicionalmente, LOXL2 reprime la expresión de otros genes asociados a TEM, como genes de polaridad celular (*Claudina-1*, *Lgl2*) en células MDCK y de carcinoma de mama (Moreno-Bueno et al., 2011, Cuevas et al., 2014, Canesin et al., 2015), o de *Notch1* en queratinocitos (Martin et al., 2015), por la unión directa o indirecta a sus regiones promotoras. Por otra parte, LOXL2 regula positivamente la transcripción de genes de varias citoquinas implicadas en la formación del nicho

premetastático, como son *GMCSF* y *TNF α* , uniéndose directamente a sus regiones promotoras (Canesin et al., 2015). Algunos autores defienden la implicación de la actividad catalítica canónica lisil oxidasa en estas funciones (Iturbide et al., 2015). No obstante, estudios previos de nuestro grupo indican que la actividad catalítica de LOXL2 no es necesaria para la represión de *E-cadherina* o de genes de polaridad celular y, por tanto, para inducir la TEM (Moreno-Bueno et al., 2011, Cuevas et al., 2014, Canesin et al., 2015), ni para inducir la diferenciación epidérmica (Lugassy et al., 2012); apoyando acciones intracelulares de LOXL2 independientes de su actividad amino oxidasa.

Más allá de las funciones específicas, la expresión de los integrantes de la familia LOX ha sido relacionada con progresión tumoral, metástasis y baja supervivencia en pacientes con diferentes tumores (Barker et al., 2012, Cano et al., 2012, Trackman, 2016b, Laurentino et al., 2019).

El miembro más estudiado de la familia a este respecto es LOXL2 (revisado en Cano et al., 2012), cuya expresión se ha asociado en diferentes tumores a invasión, metástasis y/o peor pronóstico como es el caso de cáncer de pulmón (Peinado et al., 2008, Zhan et al., 2018), gástrico (Peng et al., 2009, Brekhman et al., 2011, Kasashima et al., 2014), páncreas (Tanaka et al., 2018), colon (Brekman et al., 2011, Torres et al., 2015, Park et al., 2017), carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Peinado et al., 2008, Barry-Hamilton et al., 2010, Martin et al., 2015) o de esófago (Zhan et al., 2019) y carcinoma de mama (Barker et al., 2011, Moreno-Bueno et al., 2011, Ahn et al., 2013, Salvador et al., 2017, Wang et al., 2019). Asimismo, estudios recientes de nuestro grupo en modelos genéticos de *Lox/2* (KO y KI) en el contexto de carcinomas escamosos (Martin et al., 2015) y de mama (Salvador et al., 2017) avalan una función clave de LOXL2 en la progresión tumoral y en la metástasis.

1.6.3. LOXL3 en cáncer

Resultados recientes de nuestro laboratorio han implicado a LOXL3 en la progresión del melanoma (Santamaría et al., 2018). En concreto, LOXL3 está sobreexpresada en muestras humanas de melanoma y en una amplia cohorte de líneas celulares derivadas de

tumores primarios y metastáticos de melanoma humano frente a líneas control (líneas inmortalizadas de melanocitos humanos y líneas derivadas de piel) (Santamaría et al., 2018). Asimismo, LOXL3 participa en la melanomagénesis puesto que su sobreexpresión favorece la transformación celular y su silenciamiento frena el crecimiento tumoral de xenoinjertos de líneas celulares de melanoma humanas en ratones inmunodeprimidos. De hecho, las células de melanoma humano son dependientes de la expresión de LOXL3 ya que, tras el silenciamiento de su expresión, las células dejan de proliferar y acaban muriendo mediante apoptosis. El estudio de los mecanismos moleculares subyacentes ha permitido determinar que, en ausencia de LOXL3, las células de melanoma humano acumulan daño en el DNA y muestran una respuesta al daño en el DNA defectuosa así como mitosis aberrantes, lo que en conjunto provoca inestabilidad genómica, activando apoptosis y muerte celular (Santamaría et al., 2018).

Aparte de los datos de nuestro grupo, en la literatura hay poca información que relacione LOXL3 con cáncer. Datos iniciales mostraron elevada expresión de *LOXL3* en muestras de cáncer de ovario, mama y mesoteliomas malignos (Sebban et al., 2009), así como en neoplasias mieloproliferativas (Tadmor et al., 2013). También, LOXL3 ha sido incluida dentro de un panel de marcadores de células circulantes de tumores (CTCs) en cáncer colorrectal, donde la alta expresión de los marcadores del panel pronostica una menor supervivencia libre de progresión y menor supervivencia promedio más eficientemente que la actual tomografía computerizada (Barbazán et al., 2014). Una mayor expresión de LOXL3 también se ha relacionado con mayor capacidad de invasión celular y migración en líneas celulares de neuroblastoma humanas y en neuroblastomas en pez cebra (Zhu et al., 2017). La expresión de LOXL3, junto con la de LOXL1 y LOXL4, se ha asociado con invasión, metástasis y menor supervivencia global en pacientes de cáncer gástrico (Kasashima et al., 2018). Por último, se ha descrito la existencia de niveles elevados de LOXL3 en el plasma de pacientes de cáncer de ovario frente al plasma de pacientes control (Dufresne et al., 2018). Estos artículos son esencialmente descriptivos y, hasta el momento, los resultados funcionales más sólidos en cáncer son los que involucran a LOXL3 en melanoma. De hecho, además de la función de LOXL3 en melanoma humano descrita por

nuestro grupo, otros autores han mostrado que LOXL3 está sobreexpresada preferentemente en la MEC de muestras de melanomas metastáticos frente a melanomas menos agresivos (Naba et al., 2012).

2. Melanoma

El melanoma es un tumor originado en los melanocitos, células de origen neuroectodérmico productoras de melanina. Los melanocitos son células dendríticas pigmentadas que en adultos residen en la piel, oído interno, úvea o folículos pilosos, generalmente en la capa basal de la epidermis. Según su localización dan lugar a los principales tipos de melanoma: cutáneo (piel), uveal (ojo), acral (palmas de manos, plantas de pies o bajo las uñas) y mucoso (boca, nariz).

El melanoma es un tipo de cáncer de piel poco común y, sin embargo, es el cáncer de piel que más muertes causa. La incidencia a nivel mundial es de 15 a 25 casos por cada 100.000 individuos aunque esta incidencia varía desde los 60 casos por cada 100.000 individuos en Australia o Nueva Zelanda, hasta 1 caso por cada 100.000 individuos en poblaciones de piel oscura de Asia y África (Schadendorf and Hauschild, 2014). Esto demuestra que la exposición solar, en concreto la radiación ultravioleta (UV), es el mayor factor de riesgo para padecer melanoma cutáneo y es responsable de una firma genética asociada al melanoma que se caracteriza por una elevada tasa de mutación en comparación con otros tipos de tumores (Lawrence et al., 2013). A pesar de ser la radiación solar un factor de riesgo evitable, la incidencia de melanoma sigue aumentando cada año (ACS, 2019).

El melanoma en su inicio es una lesión local que afecta a la epidermis y crece de manera radial o en profundidad pudiendo invadir tejido subcutáneo llegando a diseminarse localmente a través de los ganglios linfáticos y/o por rutas hematógenas a sitios distantes. El melanoma es capaz de metastatizar a cualquier órgano, siendo pulmón e hígado los más frecuentes (NIH, 2019a).

El estadio del melanoma al diagnóstico se utiliza clínicamente para definir las opciones terapéuticas y está asociado al pronóstico del paciente. Así, según datos de

pacientes de Estados Unidos, si el melanoma se diagnostica como localizado la supervivencia a 5 años es del 98,4% mientras que si es regional (diseminación a ganglios linfáticos) la supervivencia disminuye al 63,6% y, si la diseminación metastática es a distancia, la supervivencia a 5 años es de tan solo el 22,5% (NIH, 2019b). El tratamiento estándar del melanoma es la resección del tumor y de los ganglios linfáticos según su afectación por la diseminación del tumor primario. En el caso del melanoma metastático, el tratamiento convencional ha consistido en quimioterapia (dacarbacina, temozolomida, fotemustina) hasta la introducción de la terapia dirigida (inhibidores de BRAF y MEK) y, más recientemente, de los inhibidores de puntos de control del sistema inmune (CTLA-4, PD-1/PD-L1) (Schadendorf and Hauschild, 2014, Schadendorf et al., 2015, Merlino et al., 2016, Queirolo et al., 2019).

2.1. Biología del melanoma

Para la generación de un melanoma es necesaria la transformación de los melanocitos mediante una serie de eventos genéticos. Los melanocitos pueden agregarse y formar un *nevus* o lunar; por ello, en el modelo clásico de progresión del melanoma de Clark, se propone que el melanoma se genera a partir de un *nevus* (Clark et al., 1984, Miller and Mihm, 2006). Sin embargo, en la mayoría de melanomas no hay evidencia de un *nevus* preexistente (Crucioli and Stilwell, 1982, Sagebiel, 1993, Shain and Bastian, 2016), lo que indica que la progresión del melanoma es más compleja y menos lineal.

La melanomagénesis se basa fundamentalmente en la hiperactivación de vías promotoras de supervivencia y proliferación; en concreto, la vía de las proteínas quinasas activada por mitógenos (MAPK) y la vía de la PI3K; así como en la inactivación de vías de control negativo del ciclo celular, como las reguladas por p14^{ARF} y p16^{INK4A} y p53 (Fig. 3 y Tabla 3). El locus *CDKN2A* codifica dos proteínas reguladoras del ciclo celular (p16^{INK4A} y p14^{ARF} reguladas por dos promotores independientes (Chin et al., 1998). p16^{INK4A} impide la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (RB) mediada por CDK4 o CDK6 (quinasas dependientes de ciclinas 4 o 6), mientras que p14^{ARF} previene la ubiquitinación y degradación de p53 mediada por la E3 ubiquitina ligasa MDM2 (Chin et al., 1998). Por otro

lado, las vías de MAPK y PI3K son activadas por la pérdida de función de NF1 (neurofibromina 1), proteína inhibidora de la señalización mediada por NRAS.

Distintos miembros de la vía de señalización de MAPK presentan mutaciones en melanoma cutáneo: un 50% de melanomas presentan la mutación BRAF^{V600E} y un 15-20% la mutación NRAS^{Q61L} o NRAS^{Q61R} siendo las mutaciones en *BRAF* y *NRAS* excluyentes entre sí. Un 10%-20% de los melanomas mucosos y acrales, que representan menos del 1% del total de melanomas, tienen mutaciones en el receptor c-KIT (KIT^{V559A}) activador de las vías MAPK/PI3K. Por último, se han descrito mutaciones en efectores de la señalización mediada por receptores acoplados a proteínas G, como GNAQ/GNA11^{Q209L} (codifican las proteínas G Gαq y Gα11, respectivamente) en el 85% de los melanomas uveales (Van Raamsdonk et al., 2010, Jakob et al., 2012, Griewank et al., 2014).

Las mutaciones en genes de la vía de MAPK permiten la señalización independiente de la unión de factores de crecimiento, de manera que la vía se encuentra activa de forma constitutiva (Fig. 3). Por ejemplo, la mutación BRAF^{V600E} permite la señalización de BRAF como monómero, frente a la forma no mutada que actúa como dímero y es dependiente de activación por RAS (Lito et al., 2012).

La otra vía frecuentemente activada en melanoma cutáneo es la vía PI3K/AKT/mTOR, que promueve supervivencia y proliferación, y cuyo principal modulador negativo es la proteína fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato 3-fosfatasa (PTEN) (Fig. 3). La combinación de la mutación en *BRAF* con mutaciones o deleciones en *PTEN* se observa en un 40% de los melanomas humanos (Tsao et al., 2004, Dankort et al., 2009, Hodis et al., 2012), mientras que la combinación de mutaciones en *NRAS* y *PTEN* es menos frecuente (en torno al 4%) (Hodis et al., 2012). Otras mutaciones en melanoma se han detectado en *PI3KCA* (subunidad catalítica α de PI3K, presente en el 2-6% de los melanomas), *AKT1* (1-2%), *AKT3* (1-2%), así como en mTOR (3%) y otros miembros de esta vía de señalización (Shull et al., 2012) (Tabla 3).

Tabla 3. Resumen de alteraciones moleculares frecuentes en melanoma cutáneo.

Vía de señalización o proceso biológico afectado	Gen o proteína	Mutación	Efecto biológico
MAPK	BRAF	V600E, V600K	Ganancia de función
MAPK	(N,H,K)-RAS	Q61R, Q61K, Q61L, G13I, G12D	Ganancia de función
MAPK & PI3K/AKT	NF1	Mutaciones con cambio de sentido o sin sentido	Pérdida de función
PI3K/AKT	PTEN	Mutaciones con cambio de sentido o sin sentido	Pérdida de función
PI3K/AKT	PI3KCA	Mutaciones con cambio de sentido	Ganancia de función
PI3K/AKT	AKT	Mutaciones con cambio de sentido	Ganancia de función
PI3K/AKT	mTOR	Mutaciones con cambio de sentido	Ganancia de función
Ciclina D/CDK4/6	<i>CDKN2A</i>	Mutaciones con cambio de sentido, sin sentido o delección	Pérdida de función
MDM2/p53	<i>CDKN2A</i>	Mutaciones con cambio de sentido, sin sentido o delección	Pérdida de función
Regulación del ciclo celular	p53	Mutaciones con cambio de sentido o sin sentido	Pérdida de función

Por otra parte, se han descrito mutaciones germinales en el locus *CDKN2A* que se corresponden con un mayor riesgo a padecer melanoma familiar (aproximadamente un 5–10% de los casos de melanoma) (Goldstein et al., 2006). Además, el locus *CDKN2A* se encuentra delecionado (total o parcialmente) o mutado en el 44% de los melanomas cutáneos (Cancer Genome Atlas, 2015). Mutaciones en *CDK4*, también asociadas a melanoma familiar, impiden su inactivación por p16^{INK4} (Zuo et al., 1996, Sheppard and McArthur, 2013). Finalmente, *TP53* también se encuentra mutado en melanomas con *CDKN2A* silvestre, lo cual sugiere que la frecuente alteración de este *locus* disminuye la presión genética para mutar *TP53* en melanoma (Hodis et al., 2012).

La mutación BRAF^{V600E} se detecta habitualmente en los lunares (>80% de los *nevi*) y es considerada un evento somático temprano (Kumar et al., 2004). La mutación BRAF^{V600E} es letal en melanoblastos en desarrollo (Dhomen et al., 2010) y, expresada en piel adulta, provoca lesiones melanocíticas benignas en las que se detecta senescencia (Bosenberg et al., 2006, Goel et al., 2009), lo que sugiere que son necesarias mutaciones secundarias adicionales para dar lugar a la transformación maligna.

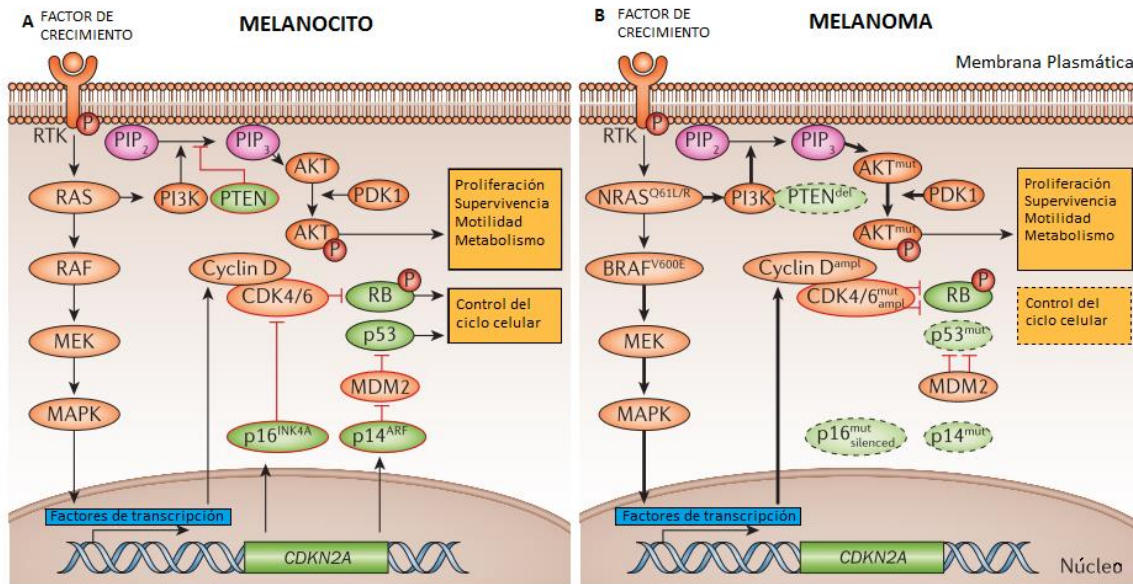


Figura 3. Vías de señalización en melanocitos alteradas frecuentemente en melanoma cutáneo. (A) Las vías de señalización MAPK y PI3K-AKT en melanocitos promueven proliferación celular dependiente de factores de crecimiento y controlada por mecanismos reguladores mediados por p16^{INK4}, p14^{ARF} y PTEN. (B) La hiperactivación de las vías de MAPK y PI3K-AKT, debida a la combinación de diversas alteraciones génicas, promueve la transformación maligna. P: grupo fosfato, PDK1: proteína quinasa dependiente de 3-fosfoinosítido 1; PIP₂: fosfatidilinositol-(4,5)-bifosfato; PIP₃: fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato; RAF: serina/treonina proteína quinasa RAF; RAS: GTPasa RAS; RTK: receptor tirosina-quinasa. Modificado de (Schadendorf et al., 2015).

Otros eventos que contribuyen a la formación y progresión del melanoma son la inactivación de vías de apoptosis, las alteraciones en el tráfico vesicular y la disregulación de la TEM (Bennett, 2008). Respecto a la TEM, se ha demostrado que durante la progresión del melanoma tiene lugar un cambio en la expresión de los TEM-FTs SNAIL2 y ZEB2 en favor de ZEB1 y TWIST1 (Caramel et al., 2013). Esta alteración es promovida por la activación de la señalización mediada por RAS/RAF y favorece la pérdida de E-cadherina y una mayor capacidad invasiva, correlacionadas con peor pronóstico (Caramel et al., 2013, Denecker et

al., 2014). De hecho, se ha descrito que la resistencia a inhibidores terapéuticos de BRAF está acompañada por la pérdida de la expresión de MITF (factor de transcripción inductor de melanocitos), E-cadherina y ZEB2, mientras que se detecta sobreexpresión de ZEB1 y TWIST1, lo que se asocia a mayor capacidad invasiva (Müller et al., 2014). En conjunto, estos datos apoyan que los procesos de TEM están asociados en melanoma con dediferenciación, invasividad y resistencia a fármacos, revisado en (Santamaria et al., 2019).

2.2. Modelos genéticos murinos de melanoma

Se han generado una serie de modelos genéticos de ratón que han resultado muy útiles para delinear las funciones de diferentes oncogenes y genes supresores de tumores en la etiología del melanoma, además de servir como modelos preclínicos (Perez-Guijarro et al., 2017). Estos modelos, en su mayoría condicionales y algunos inducibles, están basados en modificaciones genéticas dirigidas a la expresión de versiones activadas de oncogenes, en ocasiones junto a la delección de uno o más genes supresores, y que se pueden combinar o no con carcinógenos químicos y ambientales (Tabla 4). Los distintos modelos murinos difieren según el gen manipulado para inducir o incrementar la melanomagénesis: *Cdkn2a*, *Ras*, *Braf*, *Pten*, *Hgf/sf*, *Cdk4*, *Ret* y *Gnaq* (Tabla 4 y Tabla 5) (Perez-Guijarro et al., 2017). El período de latencia hasta desarrollar el melanoma primario, la penetrancia y características específicas como la diseminación metastática varían en función del promotor que regula la expresión de la/s modificación/es génica/s y el uso de diversos carcinógenos (Tablas 4 y Tabla 5).

Tabla 4. Modelos genéticos de melanoma cutáneo promovidos por agentes carcinogénicos.

Modificación genética	Promotor*	Agente inductor	Latencia (semanas)	Penetrancia (%)	Metástasis**	Referencia
<i>SV40-T tg</i>	Tyr	UVB	57	80	Sí (G,P)	(Klein-Szanto et al., 1994)
<i>HRas^{G12V}</i>	Tyr	DMBA	45	100	Sí (G,P)	(Broome Powell et al., 1999)
<i>HRas^{G12V}</i>	Tyr	UVB	45	20	No	
<i>HRas^{G12V}; Cdk4^{R24C/+}</i>	Tyr	UVR	52	40	No	
<i>HRas^{G12V}; Cdk4^{R24C/R24C}</i>	Tyr	UVR	36	83	Sí	(Hacker et al., 2006)
<i>Braf^{V600E}</i>	Tyr::CreERT ²	UVB	21	100	No	(Viros et al., 2014)
<i>HGF/SF-Tg</i>	MT1	UVR	18-25	25-56	Sí	(Noonan et al., 2001, De Fabo et al., 2004)
<i>HGF/SF-Tg; Ink4a/Arf^{+/-}</i>	MT1	UVB	25	66	Sí (G,H)	(Recio et al., 2002)
<i>HGF/SF-Tg; Ink4a/Arf^{+/-}</i>	MT1	UVB	7	75	Sí (G,H)	
<i>HGF/SF-Tg</i>	MT1	DMBA-TPA DMBA-TPA DMBA-TPA	30	100	Sí (G,P)	(Tormo et al., 2006)
<i>HGF/SF-Tg; Cdk4^{R24C/R24C}</i>	MT1		12	100	Sí (G,P)	
<i>HGF/SF-Tg; Cdk4^{R24C/+}</i>	MT1		14-16	100	Sí (G,P)	
<i>Knockin Cdk4^{R24C/R24C}</i>	-	DMBA-TPA	20	100	Sí (G)	(Sotillo et al., 2001)
<i>HGF/SF-Tg; Cdk4^{R24C/R24C}</i>	MT1	UVB	33	100	Sí (G,P)	(Gaffal et al., 2011)

*Tyr: promotor del gen *tirosinasa* (expresión restringida a melanocitos); Tyr::CreERT²: Cre inducible por 4-HT (4-hidroxitamoxifeno) bajo el control del promotor de *tirosinasa*; MT1: promotor de *Mt1* (metalotioneína 1 de expresión ubicua).

**Metástasis: G (ganglios linfáticos), P (pulmón), H (hígado).

HGF/SF-Tg: los ratones sobreexpresan Hgf (factor de crecimiento de hepatocitos) bajo el control del promotor *MT1*; SV40-T Tg: expresión del antígeno T del virus del simio 40 (SV40) bajo el promotor del gen *tirosinasa*.

DMBA: 7,12-Dimetilbenz(a)antraceno; TPA: 12-O-tetradecanoilforbol acetato; UVB: radiación ultravioleta B; UVR: radiación ultravioleta A/B.

Tabla 5. Modelos genéticos de melanoma cutáneo no promovidos por carcinógenos.

Modificación genética	Promotor*	Latencia (semanas)	Penetrancia (%)	Metástasis**	Referencia
<i>HRas</i> ^{G12V} ; <i>Ink4a</i> / <i>Arf</i> ^{-/-}	Tyr	22	61	No	(Chin et al., 1997)
<i>HRas</i> ^{G12V} ; <i>p53</i> ^{+/-}	Tyr	65	12	No	(Bardeesy et al., 2001)
<i>HRas</i> ^{G12V} ; <i>p53</i> ^{-/-}		17	26		
<i>HRas</i> ^{G12V} ; <i>p16</i> ^{Ink4a} / <i>-/-</i>	Tyr	≈75	40	No	(Sharpless et al., 2003)
<i>HRas</i> ^{G12V} ; <i>p19</i> ^{Arf} / <i>-/-</i>		≈60	≈60		
<i>NRas</i> ^{Q61K}	Tyr	>52	29	Sí (G,P,H)	(Ackermann et al., 2005)
<i>NRas</i> ^{Q61K} ; <i>Ink4a</i> / <i>Arf</i> ^{+/-}		52	83		
<i>NRas</i> ^{Q61K} ; <i>Ink4a</i> / <i>Arf</i> ^{-/-}		24	94		
<i>NRas</i> ^{G1R/G1R} ; <i>p16</i> ^{Ink4a} / <i>lox/lox</i>	Tyr::CreERT ²	26	70	No	(Burd et al., 2014)
<i>NRas</i> ^{G1R/G1R} ; <i>p16</i> ^{Ink4a} / <i>lox/lox</i> ; <i>Lkb1</i> ^{lox/lox}		22	85	Sí (G,P,H,B)	
<i>Kras</i> ^{12D/WT} ; <i>p16</i> ^{Ink4a} / <i>lox/lox</i>		36	76	No	
<i>TRE-Nras</i> ^{Q61K} ; <i>Cdkn2a</i> ^{-/-}	Tyr-rtTA	15	50	No	(Kwong et al., 2012)
<i>Kras</i> ^{G12D} ; <i>p53</i> ^{lox/lox}	Tyr::CreERT ²	39	100	No	(Liu et al., 2012)
<i>Kras</i> ^{G12D} ; <i>Lkb1</i> ^{lox/lox}		39		Sí (G,P,H,B)	
<i>Kras</i> ^{G12D} ; <i>p53</i> ^{lox/lox} ; <i>Lkb1</i> ^{lox/lox}		11		Sí (G,P,H,B)	
<i>Braf</i> ^{V600E} ; <i>Ink4a</i> / <i>Arf</i> ^{-/-}	Tyr	≈14	≈95	No	(Goel et al., 2009)
<i>Braf</i> ^{V600E} ; <i>p53</i> ^{-/-}		≈21	≈80	Sí (G, P)	
<i>Braf</i> ^{V600E} ; <i>p16</i> ^{Ink4a} / <i>-/-</i>	Tyr::CreERT ²	28	80	No	(Dhomen et al., 2009)
<i>Braf</i> ^{V600E} ; <i>Cdkn2a</i> ^{lox/lox}	Tyr::CreERT ²	14	100	Sí (G)	(Damsky et al., 2015)
<i>Braf</i> ^{V600E} ; <i>Cdkn2a</i> ^{lox/lox} ; <i>Lkb1</i> ^{lox/lox}		9		Sí (G,H,B)	
<i>Cdkn2a</i> ^{lox/lox} ; <i>Pten</i> ^{lox/lox}	Tyr::CreERT ²	36	100	No	(Held et al., 2010)
<i>Braf</i> ^{V600E}	Tyr::CreERT ²	21	100	No	(Viros et al., 2014)
<i>Braf</i> ^{V600E} ; <i>Trp53</i> ^{R172H}		14			
<i>Braf</i> ^{V600E} ; <i>Pten</i> ^{lox/lox}	Tyr::CreERT ²	5	100	Sí (G,P)/Sí (G)	(Dankort et al., 2009)/(Hooijkaas et al., 2012)
<i>Braf</i> ^{V600E} ; <i>Pten</i> ^{lox/lox} ; <i>Bcat-STA</i>	Tyr::CreERT ²	3	100	Sí (G,P,I,B)	(Damsky et al., 2011)
<i>HGF/SF-Tg</i>	MT1	60-84	22	Sí (G,P,H,B,Pa,E,F)	(Otsuka et al., 1998)
<i>HGF/SF-Tg</i>	MT1	25	25-31	Sí	(Noonan et al., 2001, De Fabo et al., 2004)
<i>Ret</i>	MT1	18	65	Sí (G,P,C)	(Kato et al., 1998)

*Tyr: promotor del gen *tirosinasa* (expresión restringida a melanocitos); Tyr::CreERT²: Cre inducible por 4-HT bajo el control del promotor de *tirosinasa*; MT1: promotor de *Mt1* (metalotioneína 1 de expresión ubicua); Tyr-rtTA: promotor de *tirosinasa* inducible por tetraciclina.

**Metástasis: G (ganglios linfáticos), P (pulmón), H (hígado), B (bazo), I (intestino), Pa (Páncreas), E (epidídimo), F (fémur), C (cerebro).

HGF/SF-Tg: los ratones sobreexpresan Hgf (factor de crecimiento de hepatocitos) bajo el control del promotor *MT1*; Ret: los ratones expresan el receptor Ret bajo el control del promotor *MT1*.

El modelo de melanoma elegido para el desarrollo del proyecto de la presente tesis es el generado por Dankort y colaboradores, basado en la activación de Braf y la delección de *Pten* de forma condicional e inducible (Dankort et al., 2009). Los ratones de este modelo presentan las modificaciones genéticas: *Tyr::CreER^{T2}*; *Braf^{ΔV600E/+}*; *Pten^{lox/lox}* de manera que la administración tópica de 4-hidroxitamoxifeno (4-HT) induce la activación de la recombinasa Cre expresada exclusivamente en melanocitos lo que a su vez promueve los reordenamientos génicos que permiten la expresión del alelo *Braf^{ΔV600E}* y la delección de *Pten* (ver Materiales y Métodos Fig. 5). Este modelo reproduce el desarrollo del melanoma cutáneo humano, generando lesiones primarias con una penetrancia del 100% en 4 o 5 semanas que progresan a lo largo del tiempo y presentan metástasis en nódulos linfáticos y órganos distantes (Dankort et al., 2009). La penetrancia total y la baja latencia características de este modelo, junto con su capacidad de metástasis a ganglios linfáticos y pulmón (Tabla 5), fue determinante para utilizarlo con el fin de estudiar la función de Loxl3 en el desarrollo del melanoma *in vivo* así como su implicación en la diseminación metastática.



OBJETIVOS

Objetivos

La presente tesis doctoral se desarrolló con la doble finalidad de: 1) estudiar la implicación de *Loxl2* y *Loxl3* durante el desarrollo embrionario, y 2) determinar la implicación de *Loxl3* en la iniciación y progresión del melanoma. Con este fin se establecieron los siguientes objetivos:

- ❖ Estudiar el desarrollo embrionario de ratones que carecen de *Loxl2* y *Loxl3*.
- ❖ Caracterizar la función de *Loxl3* en líneas celulares de melanoma murino.
- ❖ Generar y caracterizar un modelo genético de melanoma murino con pérdida de función condicional de *Loxl3*.
- ❖ Determinar la implicación de *Loxl3* en la melanomagénesis, progresión tumoral y diseminación metastática en el modelo de melanoma murino generado.



MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y métodos

1. Modelos de ratón

Los estudios con animales han sido llevados a cabo en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM) y en el animalario del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (CSIC-UAM) de acuerdo con los protocolos aprobados por la Comunidad Autónoma de Madrid (CAM), Consejería de Medio Ambiente (PROEX 182/14; PROEX 122/17) y por el Comité de Ética para la experimentación animal de la UAM (CEI-25-587) bajo la certificación de capacitación personal CAP-T-1929 otorgada por la CAM (Madrid, 25/04/2018).

1.1. Generación del modelo de melanoma murino con delección condicional de *LoxI3*

El modelo de melanoma murino se generó partiendo de una línea de ratón que porta un alelo para la delección condicional de *LoxI3* ($L3^{loxP}$), desarrollado previamente en el grupo (Floristán, 2015) (Tabla 6, Fig. 4). Brevemente, en el ratón que contiene el alelo $L3^{loxP}$, el exón 3 del gen *LoxI3* se encuentra flanqueado por secuencias *loxP* por lo que la recombinación mediada por la enzima Cre provoca la pérdida completa del exón 3 y parte de las secuencias 3' y 5' en torno a dicho exón. La traducción del mRNA tras la modificación del gen genera una proteína LoxI3 truncada no funcional de 131 aa frente a los 754 aa de la proteína LoxI3 silvestre en ratón (Floristán, 2015). Para generar el modelo con delección condicional de LoxI3 en melanocitos, ratones de la línea $L3^{loxP}$ se cruzaron con la línea *Tyr::CreER^{T2}: Braf^{V600E/+}; Pten^{loxP/loxP}* (Tabla 6, Fig. 5), denominada Braf/Pten, generada y descrita por Dankort y colaboradores, que recapitula la enfermedad de melanoma humano en ratón (Dankort et al., 2009). Tras los cruces necesarios, se obtuvo la nueva línea de ratón: *Tyr::CreER^{T2}: Braf^{V600E/+}; Pten^{loxP/loxP}; LoxI3^{loxP/loxP}* (Tabla 6, Fig. 6), a la que a partir de ahora denominaremos Braf/Pten/LoxI3. En este ratón se expresa la proteína de fusión CreER bajo el control de promotor del gen *tirosinasa* (*Tyr*); tras el tratamiento con 4-hidroxitamoxifeno (4-HT), se produce la translocación al núcleo y por tanto la activación de la recombinasa Cre

que provoca la recombinación génica en los alelos modificados dando lugar a la expresión de una proteína *Braf* mutante y constitutivamente activa (*Braf*^{VE/+}) y a la pérdida de la expresión de *Pten* (*Pten*^{-/-}) y de *Lox13* (*L3*^{-/-}) en las células que expresan tirosinasa, que son fundamentalmente los melanocitos (Fig. 6).

Tabla 6. Modelos genéticos utilizados durante el desarrollo de la tesis (se destacan con un asterisco los modelos que se han generado durante la tesis).

Modelo genético	Modificación	Abreviatura	Referencia
Heterocigoto <i>Lox13</i>	<i>Lox13</i> ^{+/LacZ}	<i>L3</i> ^{+/LacZ}	(Floristán, 2015)
Condiciónal <i>Lox13</i>	<i>Lox13</i> ^{loxP/loxP}	<i>L3</i> ^{loxP}	(Floristán, 2015)
KO constitutivo <i>Lox13</i>	<i>Lox13</i> ^{LacZ/LacZ}	<i>L3</i> ^{LacZ}	(Floristán, 2015)
KO heterocigoto <i>Lox12</i>	<i>Lox12</i> ^{+/-}	<i>L2</i> ^{+/-}	(Salvador, 2014)
KI heterocigoto <i>Lox12</i>	<i>Rosa26</i> ^{+/-L2}	<i>R26</i> ^{+/-L2}	(Salvador, 2014)
KI constitutivo <i>Lox12</i>	<i>Rosa26</i> ^{L2/L2}	<i>L2</i> -KI	(Salvador, 2014)
Melanoma murino	<i>Braf</i> ^{V600E/+} ; <i>Pten</i> ^{loxP/loxP}	<i>Braf</i> / <i>Pten</i>	(Dankort et al., 2009)
Doble KO <i>Lox12/Lox13</i>	<i>Lox12</i> ^{-/-} ; <i>Lox13</i> ^{LacZ/LacZ}	<i>L2</i> -KO/ <i>L3</i> -KO	(Floristán, 2015)
KI <i>Lox12</i> KO <i>Lox13</i> *	<i>R26</i> ^{L2/L2} ; <i>Lox13</i> ^{LacZ/LacZ}	<i>L2</i> -KI/ <i>L3</i> -KO	
Melanoma murino condicional <i>Lox13</i> *	<i>Braf</i> ^{V600E/+} ; <i>Pten</i> ^{loxP/loxP} ; <i>Lox13</i> ^{loxP/loxP}	<i>Braf</i> / <i>Pten</i> / <i>Lox13</i>	

KO: ratón con delección de 1 o 2 alelos del gen de interés

KI: ratón con sobreexpresión de *Lox12* en el locus *Rosa 26*

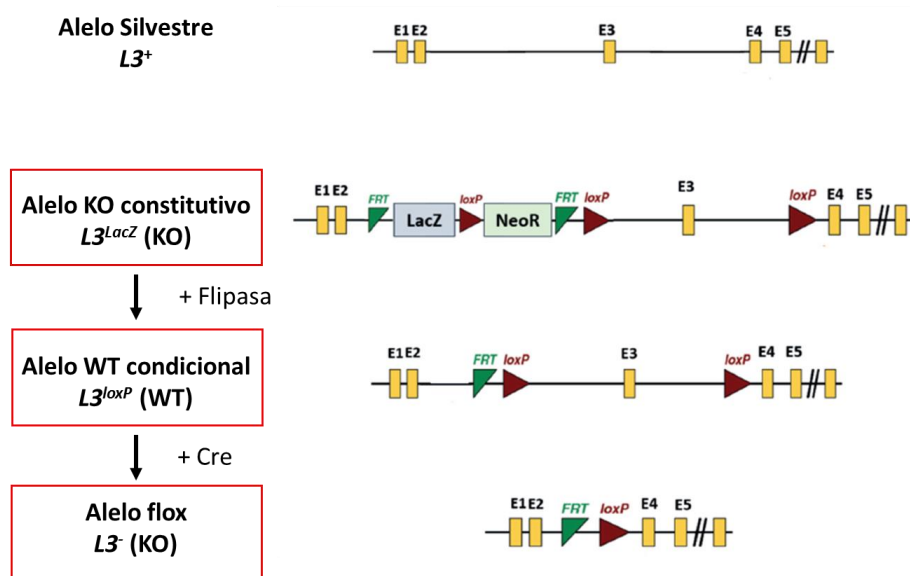


Figura 4. Esquema génico de los alelos de *Lox13* presentes en los distintos modelos. Se muestran tanto el alelo silvestre del locus de *Lox13* (*L3*⁺) como las distintas modificaciones introducidas mediante recombinación homóloga en el gen: *L3*^{LacZ} alelo KO constitutivo (KO); *L3*^{loxP} alelo WT condicional (WT) tras el cruce con la cepa de ratón que expresa la recombinasa flipasa; y *L3*⁻ alelo flox (KO) resultante del cruce posterior con la cepa que expresa la recombinasa Cre. Modificado de (Floristán, 2015).

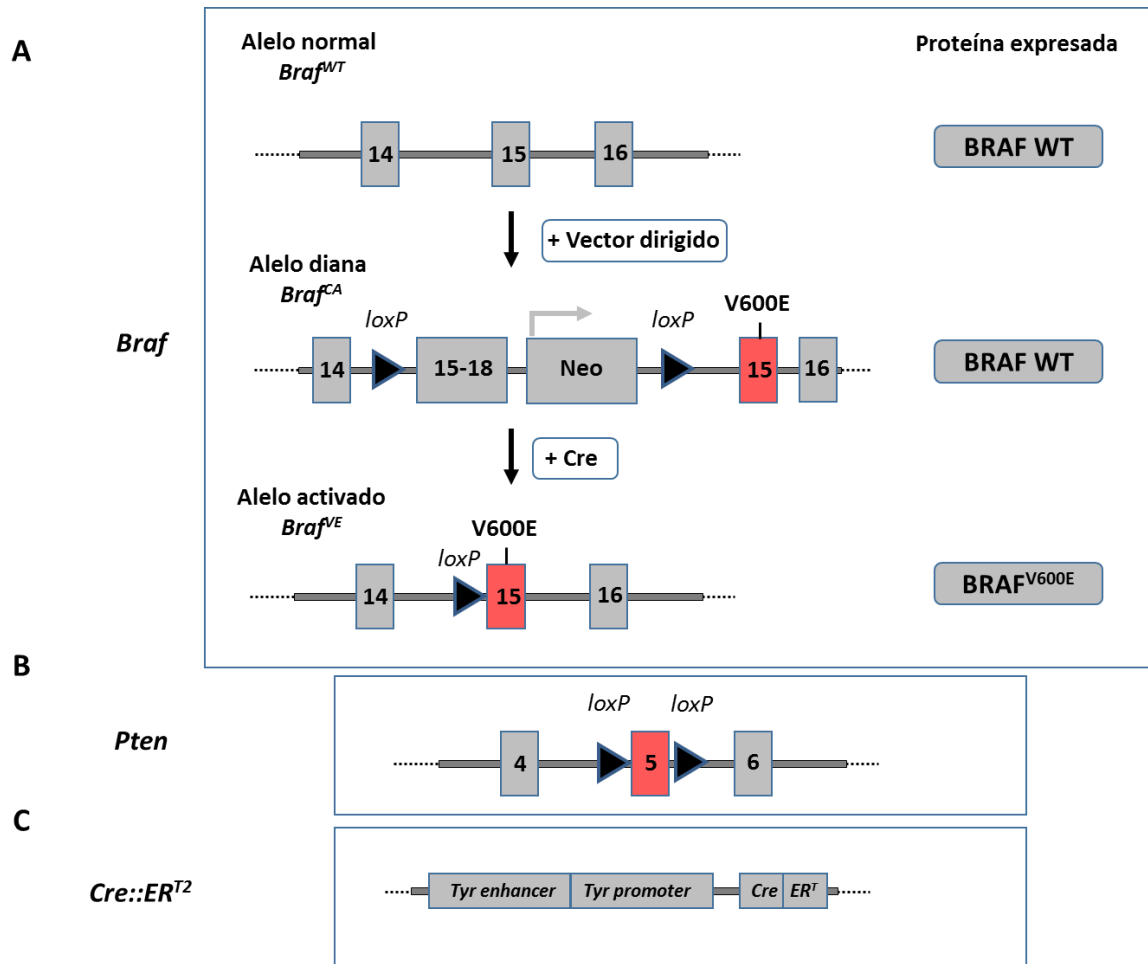


Figura 5. Esquema génico de los alelos *Braf* y *Pten* y del transgén *Cre::ER^{T2}* del modelo de melanoma murino de Dankort y colaboradores. (A) Representación esquemática de la incorporación del alelo *Braf*^{CA} en el locus de *Braf*. Arriba se representa el locus génico del alelo *Braf* silvestre (*Braf*^{WT}). Tras la inserción del vector dirigido (centro), detallado en (Dankort et al., 2007), se genera el alelo diana *Braf*^{CA} que incorpora los exones 15 a 18 silvestres y un codón de parada de la transcripción. A continuación se localiza el exón 15 modificado (en rojo) incorporando la mutación puntual que codifica *Braf*^{V600E} tras el que siguen los exones silvestres restantes. Abajo se indica el alelo resultante después de la recombinación mediada por Cre, *Braf*^{VE}, que codifica la proteína *Braf* activada constitutivamente. En la parte de la derecha se detallan las proteínas expresadas en cada caso. **(B)** Se muestra el alelo *Pten* con el exón 5 flanqueado por sitios loxP. Modificado de (Lesche et al., 2002). **(C)** Se muestra la estructura del transgén *Cre::ER^{T2}* donde la proteína de fusión *CreER^{T2}* se expresa bajo el promotor y *enhancer* murino del gen *tirosinasa*. Modificado de (Bosenberg et al., 2006).

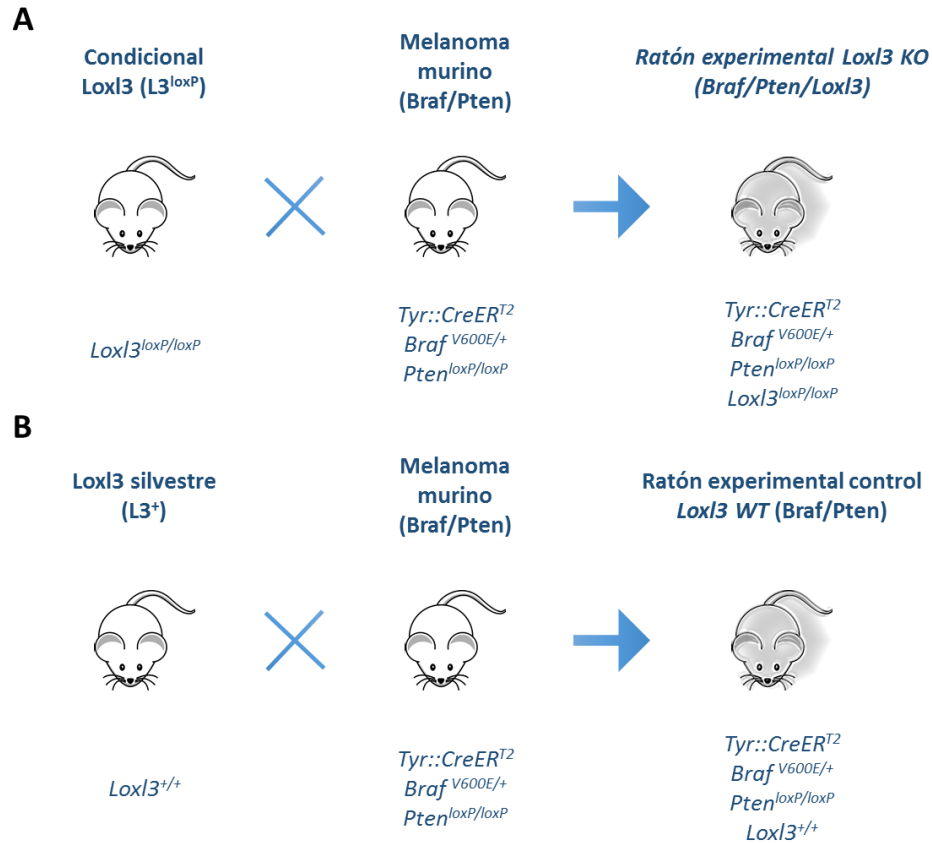


Figura 6. Esquema de las distintas líneas utilizadas en la generación del modelo de melanoma murino con deleción condicional de *Lox13*. En (A) se muestran los cruces utilizados para generar la línea de melanoma murino condicional para *Lox13* *Braf/Pten/Lox13* (ratón experimental), y en (B) la línea de melanoma murino *Braf/Pten* con *Lox13* silvestre (ratón experimental control).

1.2. Generación de modelos genéticos con modificación constitutiva en los genes

Lox12 y *Lox13*

1.2.1. Modelo de doble deleción de *Lox12* y *Lox13* (*L2-KO/L3-KO*)

Los animales portadores de los alelos *Lox13^{+/LacZ}* (*L3^{+/LacZ}*) y *Lox12^{+/-}* (*L2^{+/-}*) se generaron previamente en el laboratorio (Salvador, 2014, Floristán, 2015, Martin et al., 2015) (ver Fig. 4 y Fig. 7). Para la obtención de ratones doble KO (*L2-KO/L3-KO*) para los genes *Lox12* y *Lox13*, se cruzaron animales heterocigotos para los alelos KO constitutivos de cada gen (*Lox12^{+/-}* X *Lox13^{+/LacZ}*) (Tabla 6 y Fig. 8) y se determinó el genotipo de las camadas resultantes, así como en embriones obtenidos a diferentes estadios de desarrollo embrionario.

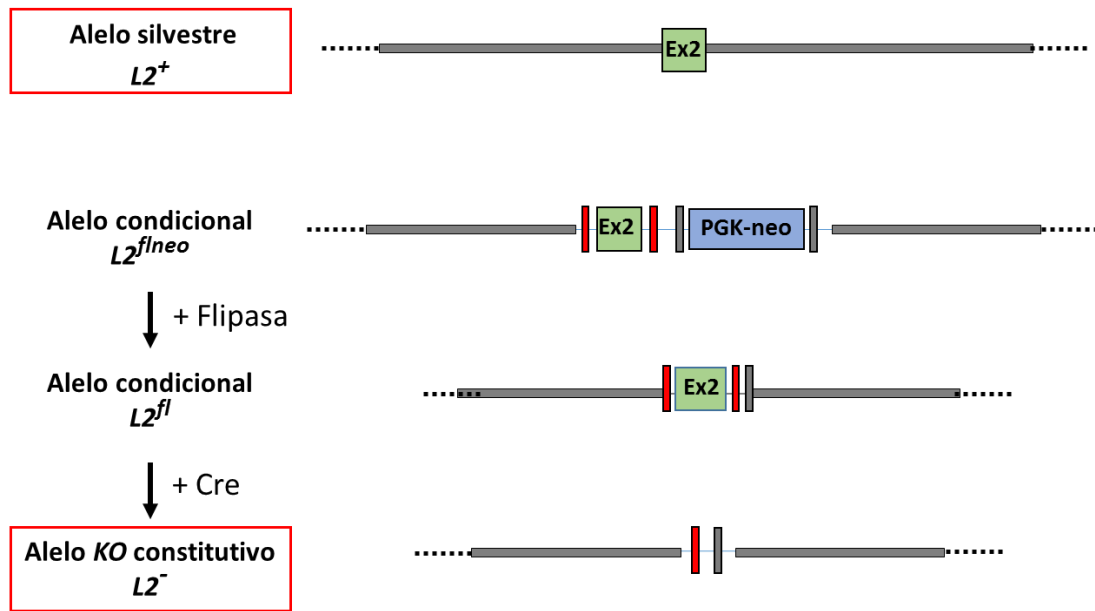


Figura 7. Esquema génico de los alelos de *Loxl2* utilizados para el generar el ratón *Loxl2* KO. Se muestran tanto el alelo silvestre del *locus* de *Loxl2* ($L2^{+}$) como las distintas secuencias introducidas mediante recombinación homóloga (alelo condicional $L2^{flneo}$) y los alelos resultantes de los cruces secuenciales con las líneas de ratón que portan las recombinasas flipasa y Cre para generar los alelos *Loxl2* WT condicional ($L2^{fl}$) y KO constitutivo ($L2^{-}$), respectivamente. Ex 2: exón 2 del gen de *Loxl2*. Tomado de (Salvador, 2014).

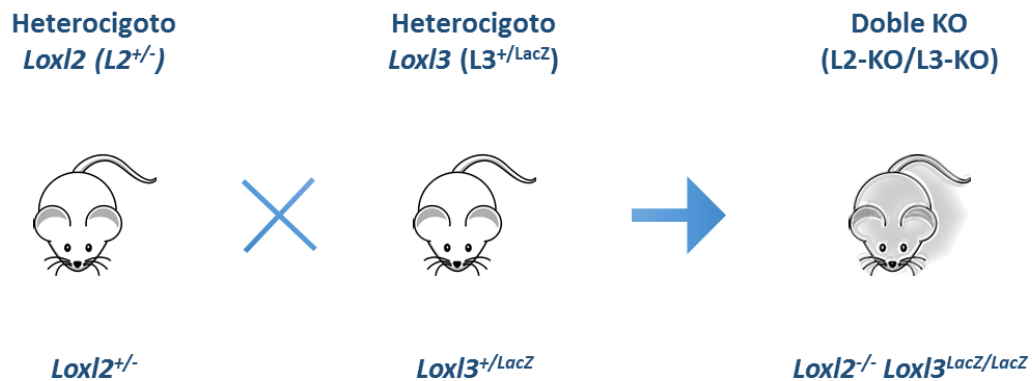


Figura 8. Esquema del cruce utilizado para la generación del modelo de ratón con doble delección de *Loxl2* y *Loxl3*. Se muestran los cruces entre heterocigotos de ambos alelos.

1.2.2. Modelo de sobreexpresión de *Lox12* y delección de *Lox13* (L2-KI/L3-KO)

En el laboratorio se generó previamente un modelo de sobreexpresión constitutiva de *Lox12* (KI) en el que se expresa el tándem *Lox12*/GFP bajo el control del promotor *Rosa26* ($R26^{L2}$) (Salvador, 2014, Martin et al., 2015) (Fig. 9).

La obtención de ratones KI para *Lox12* y KO para *Lox13* (Tabla 6 y Fig. 10) se llevó a cabo cruzando animales heterocigotos para los alelos de cada uno de los genes ($R26^{+/L2}$ X $Lox13^{+/LacZ}$) para obtener animales dobles heterocigotos que a su vez se cruzaron entre sí ($R26^{+/L2}; Lox13^{+/LacZ}$ X $R26^{+/L2}; Lox13^{+/LacZ}$) con el fin de obtener los genotipos de interés. Los diferentes genotipos resultantes se analizaron en animales tras el destete.

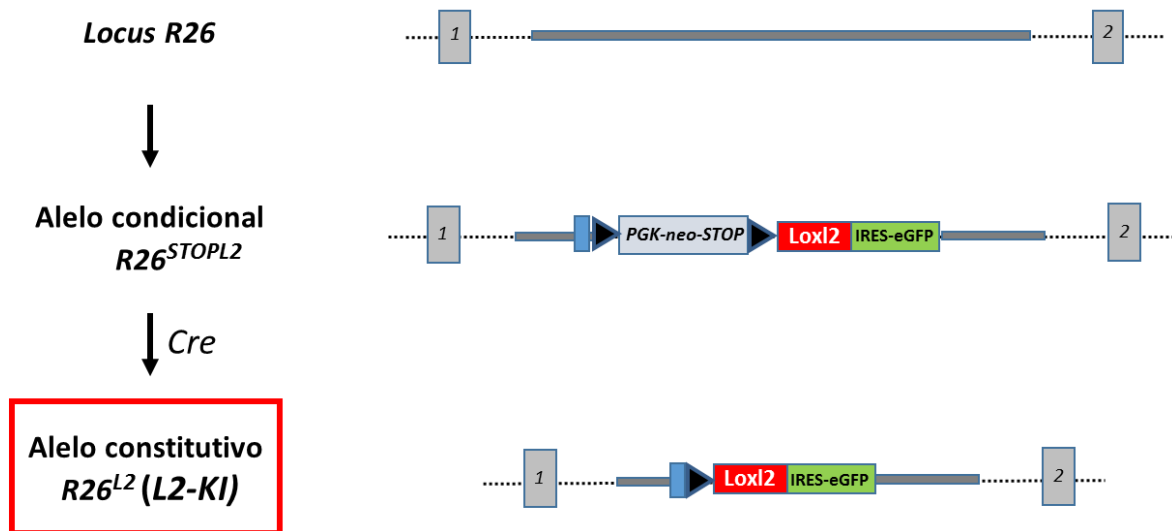


Figura 9. Esquema génico de los alelos del locus *R26* utilizados para la sobreexpresión (KI) de *Lox12*. Se muestran los exones 1 y 2 del alelo silvestre del locus *R26* (arriba), las secuencias introducidas mediante recombinação homóloga para la generación del alelo condicional $R26^{STOPL2}$ (centro) y el alelo resultante (abajo) tras el cruce con una línea de ratón que expresa la recombinasa *Cre*: alelo *Lox12* constitutivo $R26^{L2}$ (L2-KI). Tomado de (Salvador, 2014).

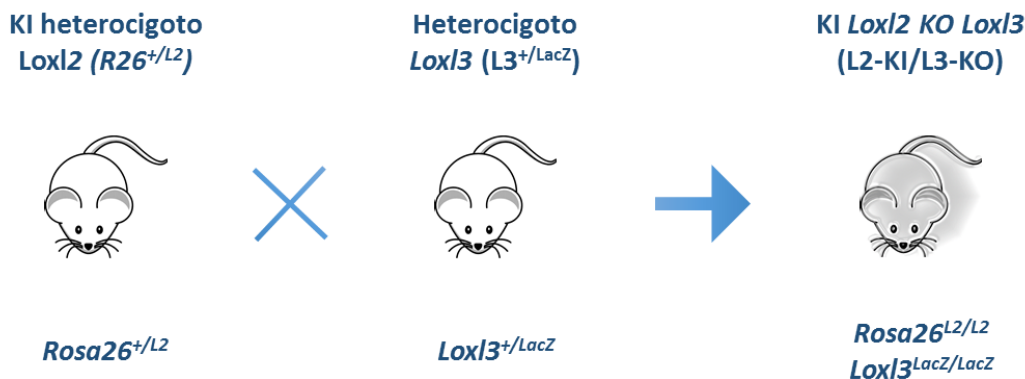


Figura 10. Esquema de los cruces utilizados para la generación del modelo de sobreexpresión de *Loxl2* y deleción de *Loxl3* (*L2*-KI/*L3*-KO). Se muestran los cruces entre heterocigotos de ambos alelos.

1.3. Genotipado de ratones

El genotipado de los distintos modelos murinos se llevó a cabo extrayendo en primer lugar el DNA genómico a partir de la cola o de la oreja de ratones de entre 25 y 30 días de edad, o de los estadios embrionarios indicados en su caso. Se siguió el protocolo universal de extracción de DNA con sal y precipitación con isopropanol (Aljanabi and Martinez, 1997). La presencia o ausencia de los diferentes alelos, así como la presencia de determinadas modificaciones (sitios *loxP* y *frt*) se evaluó mediante PCR a partir de aproximadamente 200 ng de DNA utilizando los oligonucleótidos indicados en la Tabla 7.

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando los reactivos *Redextract-N-Amp Reaction Mix* (Sigma) y *Supreme NZYtaq 2x* (Nzytech), siguiendo las instrucciones del fabricante, y los oligonucleótidos correspondientes (Tabla 7). Las condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de cada alelo se detallan a continuación:

Alelos *L3⁺*, *L3^{LacZ}*, *L3^{loxP}*, *L3^{flox}*, *Cre*

Paso 1: 94 °C 4 min

Paso 2: (94 °C 30 s, 63 °C 30 s, 72 °C 30 s) 30 ciclos

Paso 3: 72 °C 5 min

Análisis de los productos de PCR mediante electroforesis de DNA en geles 1 % agarosa.

Alelos $L2^+$, $L2^-$

Paso 1: 94 °C 5 min

Paso 2: (94 °C 30 s, 62 °C 30 s, 72 °C 30 s) 30 ciclos

Paso 3: 72°C 5 min

Análisis de los productos de PCR mediante electroforesis de DNA en geles 1 % agarosa.

Alelos $R26^+$, $R26^{L2}$

Paso 1: 94 °C 5 min

Paso 2: (94 °C 30 s, 65 °C 30 s, 72 °C 30 s) 30 ciclos

Paso 3: 72 °C 2 min

Análisis de los productos de PCR mediante electroforesis de DNA en geles 1 % agarosa.

Alelos $Pten^+$, $Pten^{loxP}$, $Pten^{flox}$

Paso 1: 95 °C 5 min

Paso 2: (95°C 30 s, 60,5 °C 30 s, 72 °C 1 min) 30 ciclos

Paso 3: 72°C 5 min

Análisis de los productos de PCR mediante electroforesis de DNA en geles 1 % agarosa.

Alelos $Braf^{CA}$, $Braf^{V600E}$

Paso 1: 94 °C 5 min

Paso 2: (94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 35 s) 33 ciclos

Paso 3: 72 °C 5 min

Análisis de los productos de PCR mediante electroforesis de DNA en geles 3 % agarosa.

Alelo $Braf^{WT}$

Paso 1: 94 °C 4 min

Paso 2: (94 °C 30 s, 63 °C 1 min, 72 °C 1 min) 35 ciclos

Paso 3: 72 °C 2 min

Análisis de los productos de PCR mediante electroforesis de DNA en geles 2 % agarosa.

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para el genotipado de los distintos alelos.

Alelo	Oligonucleótido Fw	Oligonucleótido Rv	Tamaño amplicón (pb)
<i>L3⁺/L3^{loxP}</i>	CAGAAAAACGCCACAGGGGAGACG	GCCTCACTCGGCCTTGAGGCTAATC	1550/1699
<i>LacZ</i>	CGTCGTTTTACAACGTCGTGAC	TAACAAACCCGTCGGATTCTC	345
<i>L3⁻</i>	CAGAAAAACGCCACAGGGGAGACG	CGGAGTCGCACCTCCTCCACTTGC	825
<i>L2⁺</i>	TGGAGGTCTACTACGAAGGC	GAGGTGGGCACAGACTAATC	430
<i>L2⁻</i>	ATCGGGAATTCAGACTGCTG	GAGGTGGGCACAGACTAATC	410
<i>Cre</i>	GCCTGCATTACCGGTCGATGC	CAGGGTGTTATAAGCAATCCCC	430
<i>Braf^{WT}/Braf^{CA}/Braf^{V600E}</i>	TGAGTATTTTTGTGGCAACTGC	CTCTGCTGGGAAAGCGGC	185/308/335
<i>Pten^{+/+}/Pten^{loxP}/Pten^{fllox}</i>	ACTCAAGGCAGGGATGAGC	AATCTAGGGCCTCTTGTCGCGCTTGATATCGAATTCCTGCAGC	900/1000/300
<i>R26⁺</i>	TATCAGTAAGGGAGCTGCAGTG	ACCCAGATGACTACCTATCCTC	300
<i>R26^{L2}</i>	TATCAGTAAGGGAGCTGCAGTG	CCCACTGGCCTTCGTAGTAGAC	750

2. Líneas y cultivos celulares

2.1. Líneas celulares utilizadas

La línea celular HEK293T se utilizó para la producción de lentivirus. Esta línea celular procede de tejido renal embrionario humano y está transformada con el antígeno T grande del virus SV40 (ATCC # CRL-11268). Se creció en medio de cultivo DMEM suplementado con 10 % FBS (*fetal bovine serum*), 2 mM L-glutamina, 1 % de penicilina/estreptomicina y 2,5 µg/mL de fungizona, en ambiente humidificado y conteniendo 5 % CO₂.

La línea celular de melanoma murino B16F10, altamente metastática (proporcionadas por el laboratorio del Dr. Héctor Peinado, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, CNIO, Madrid), se creció en medio de cultivo DMEM suplementado con 5 % de FBS, 2 mM de L-glutamina, 2 µg/mL de gentamicina (Normon) y 2,5 µg/mL de fungizona en ambiente humidificado y conteniendo 5 % CO₂.

2.2. Vectores virales, producción de lentivirus e infecciones lentivirales

Para la generación de lentivirus se sembraron $4,5 \times 10^6$ células HEK293T en placas p100 (Falcon) en medio DMEM suplementado con 10 % de FBS sin antibióticos. Al día siguiente fueron transfectadas con Lipofectamine2000 (Invitrogen) 25 μ L/placa p100, con los plásmidos de empaquetamiento lentiviral (3,2 μ g de psPAX2 y 1,6 μ g de pMD2.G) y con 5 μ g del vector lentiviral conteniendo las secuencias shRNA de interés. Los sobrenadantes celulares, que contenían las partículas infecciosas lentivirales, fueron recogidos a las 48 h y 72 h posteriores a la transfección, habiendo añadido, en su caso, medio DMEM conteniendo 10 % FBS fresco a las 48 h. El medio recogido fue centrifugado durante 5 min a 1.000 rpm (Centrífuga Rotina38, Hettich) y el sobrenadante resultante se congeló en alícuotas a -80°C para su posterior utilización.

Las infecciones lentivirales se llevaron a cabo añadiendo sobrenadante lentiviral (4 mL/p100) y polibreno (8 μ g/mL) a las células de interés, que presentaban una confluencia aproximada del 60 %. Tras 24 h, se añadía 6 mL de medio completo (DMEM-10 % FBS, 2 mM L-glutamina, 1 % de penicilina/estreptomicina y 2,5 μ g/mL de fungizona) y, después de 48 h de infección, las células se seleccionaban en el medio correspondiente en presencia de puromicina 1 μ g/mL.

2.3. Silenciamiento de la expresión de *Lox13* en células de melanoma murino

La línea de melanoma murino B16F10 se infectó con los lentivirus generados con los vectores lentivirales pLKO-NTC, pLKO-shLox13#2 y pLKO-shLox13#3 (Tabla 8) que expresan tras su inserción en el genoma de las células infectadas, horquillas cortas de RNA (shRNA) control (NTC) o que se unen al mRNA diana (*Lox13*) (shLox13#2, #3) favoreciendo su degradación o impidiendo su traducción (Paddison et al., 2002). Tras la infección, los cultivos se seleccionaron y mantuvieron en presencia de puromicina (1 μ g/mL) durante al menos 48 h.

Tabla 8. Secuencia diana de las horquillas cortas de RNA utilizados.

Nombre del sh	Gen diana	Secuencia diana
sh#NTC	-	Control sin diana (Sigma)
shLoxl3#2	Loxl3	CCGCGTTACCTCTAGCCATT
shLoxl3#3	Loxl3	CTAGTAACCAGATCGTCTAAA

3. Ensayos celulares *in vitro*

3.1. Ensayos de proliferación

La proliferación celular de las distintas líneas celulares se determinó mediante dos abordajes:

a) Recuento de células utilizando cámaras de contaje (Kova International). Para ello se sembraron de 2.000 a 5.000 células/pocillo por triplicado, según la tasa de proliferación de cada línea celular, en placas de 24 pocillos (Falcon) y se contó el número de células en cada pocillo los días 1, 3, 6 y 7 post-siembra tras lavarlas con PBS e incubarlas con tripsina (Gibco) para levantarlas. El número de células obtenido se relativizó frente al valor inicial (día 1) para cada línea celular para determinar la tasa de proliferación en función del tiempo.

b) Evaluación de la tasa de proliferación con un kit de proliferación MTT (bromuro de 3-(4 5-dimetiltiazol-2-il)-2 5-difeniltetrazolio) (Kit MTT Roche) que permite evaluar la actividad metabólica celular mediante colorimetría y, de forma indirecta, la proliferación celular. Se sembraron 2.500 células/condición por triplicado en placas de 96 pocillos (Falcon). El protocolo recomendado por el fabricante y resumido consiste en: 1) incubar las células durante 4 h a 37 °C en presencia de un sustrato pigmentado (reactivo 1, que va a ser metabolizado generando un producto-sal insoluble con color); 2) añadir el reactivo 2 durante 24 h a 37 °C que disuelve la sal e inactiva a las células; y 3) medir la Abs a 570 nm en un espectrofotómetro (Synergy HT, Biotek). Se sembraron las placas 5 días tras la infección lentiviral una vez seleccionadas en medio con puromicina y se evaluó la proliferación los días 1, 2, 3 y 4 post-siembra. Los valores obtenidos se relativizaron frente

al valor inicial (día 1) de cada línea celular para determinar la tasa de proliferación en función del tiempo.

3.2. Crecimiento de colonias

Se realizaron dos tipos de ensayos para analizar el crecimiento de colonias:

a) Ensayo de formación de colonias o crecimiento de colonias dependiente de anclaje: se sembraron 250 células en placas de 6 pocillos (Falcon) y se dejaron crecer durante 3 semanas cambiando el medio de cultivo semanalmente. Las colonias crecidas se fijaron con paraformaldehído (PFA) (Merck) 4 % durante 20 min y después se tiñeron con cristal violeta (0,5 % en agua) (Sigma). Se realizaron fotos de los pocillos en un microscopio de campo claro (Nikon Eclipse TS100), el objetivo 4x y la cámara Nikon ELWD 0.3/OD 75 y se contaron las colonias utilizando el programa informático ImageJ (National Institute of Health).

b) Ensayo de transformación o crecimiento de colonias independiente de anclaje en agar semisólido: este experimento se basa en la formación de 2 capas de distinta concentración de agarosa (Lonza). La capa inferior se genera utilizando 0,7 % agarosa en medio de cultivo (volumen total 800 μ L). La capa superior se genera con 0,35 % de agarosa en medio de cultivo (volumen total 300 μ L). En esta última solución se embebe un número de células adecuado (5.000-10.000 células/pocillo) antes de que solidifique y a continuación se añade sobre la capa inferior solidificada para formar el medio de crecimiento semisólido. Para impedir la deshidratación de las capas de agarosa, se añaden 800 μ L de medio de cultivo encima de la capa superior. El experimento se realizó en placas de 12 pocillos (Falcon) por triplicado y las colonias se dejaron crecer 1 semana. Para contar las colonias se realizaron fotos en el microscopio de campo claro (Nikon Eclipse TS100) utilizando el objetivo 4x y el programa informático ImageJ (National Institute of Health).

3.3. Análisis del ciclo celular

Para el análisis del ciclo celular se sembraron 1×10^5 células en placas p60 (Falcon) y se dejaron crecer durante 36-48 h. Las células se levantaron con tripsina y se lavaron 2 veces con PBS tras centrifugarlas a 1.200 rpm. Las células se resuspendieron en 300 μ L de PBS y se fijaron con 700 μ L de etanol 100 % frío y se incubaron durante un mínimo de 4 h a -20°C . Para su análisis, se lavaron de nuevo con PBS, centrifugándolas a 13.000 rpm, y se resuspendieron en 300 μ L de PBS conteniendo 0,05 mg/mL de yoduro de propidio y RNasa A (15 μ g/mL) e incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Las células se analizaron mediante citometría de flujo (citómetro Cytomics FC 500MPL, Beckman Coulter). Los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular fueron determinados mediante el programa Modfit LT.

3.4. Análisis de la apoptosis mediante citometría de flujo

Para evaluar el porcentaje de células en apoptosis se sembraron $1,5 \times 10^5$ células en placas de 6 pocillos. Las células se levantaron con tripsina al 0,05 % en PBS y, tras lavarlas con PBS, se resuspendieron en 50 μ L de PBS, se añadió 50 μ L de tampón de unión (10 mM Hepes/NaOH pH 7,4, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl_2) con 1,2 μ L de yoduro de propidio (0,05 mg/mL) y 1 μ L de Anexina-V conjugada a FITC (A-V; ImmunoStep, ANXVF-200T). Tras incubar las células durante 15 min a temperatura ambiente se añadieron 150 μ L de tampón de unión. Finalmente, las muestras se analizaron citometría de flujo (citómetro BD FACScanto). Para la correcta separación de las poblaciones (anexina +/- y/o yoduro de propidio +/-) se utilizaron como control células sin marcar, células marcadas únicamente con anexina o solo con yoduro de propidio.

4. Estudios *in vivo*

4.1. Tratamientos con 4-HT en el modelo murino de melanoma

Los animales eran tratados al mes de nacimiento en el lomo previa rasuración, durante tres días consecutivos con 5 μ L de 4-HT disuelto en etanol 100 % a 2 mg/mL.

En un primer experimento en el que los animales se sacrificaron por los criterios de punto final establecidos en el protocolo de ética experimental (entre 90-160 días tras el tratamiento con 4-HT) se evaluó el día de aparición de las lesiones iniciales en cada animal. Además, se registró la supervivencia global de los animales, entendida como el tiempo transcurrido tras la aplicación de 4-HT y hasta que los animales debían ser sacrificados porque la lesión tumoral presentaba una extensión superficial ≥ 2 cm de diámetro o ulceración del mismo, o por los criterios de punto final establecidos en el protocolo de ética experimental aprobado (PROEX 182/14, PROEX 122/17). También se evaluó la presencia de lesiones en pulmón y la histología y fenotipo del tumor primario tras su extracción, fijación y preparación en bloques de parafina (ver sección 5).

Al observarse diferencias morfológicas y de pigmentación de los ganglios linfáticos de animales *L3-KO* y animales control *L3-WT*, se realizó un segundo experimento en el que los animales eran tratados de igual manera pero los dos grupos eran sacrificados 42 días tras el tratamiento con 4-HT. En la necropsia se evaluó la colonización por parte de células de origen melanocítico de los ganglios subilíacos y de los ganglios superficiales parotídeos (Fig. 11) así como sus características fenotípicas e histológicas, tras su extracción y procesamiento como se comenta en la sección 5. También se analizó la progresión de las lesiones iniciales haciendo un análisis de su crecimiento superficial mediante el programa informático Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems Incorporated).

#	English name	Official name
1	Mandibular lymph node (Ln.)	Ln. mandibularis
2	Accessory mandibular Ln.	Ln. mandibularis accessorius
3	Superficial parotid Ln.	Ln. parotideus superficialis
4	Cranial deep cervical Ln.	Ln. cervicalis profundus cranialis
5	Proper axillary Ln.	Ln. axillaris proprius
6	Accessory axillary Ln.	Ln. axillaris accessorius
7	Subiliac Ln.	Ln. subiliacus
8	Sciatic Ln.	Ln. ischiadicus
9	Popliteal Ln.	Ln. popliteus
10	Cranial mediastinal lnn.	Lnn. mediastinales craneales
[...]		

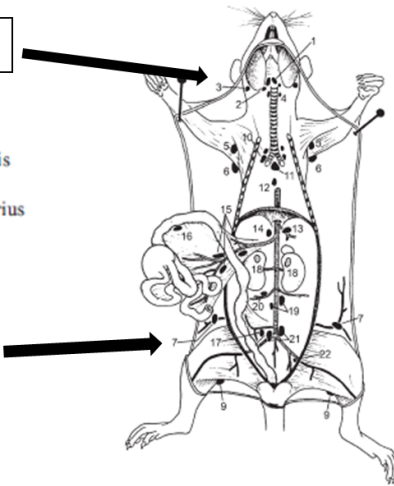


Figura 11. Listado de los ganglios linfáticos presentes en el ratón BALB/c y esquema de su localización anatómica. Modificado de (Van den Broeck et al., 2006).

4.2. Ensayos de tumorigénesis

Los ensayos de tumorigénesis se llevaron a cabo en ratonas C57BL/6JRj de 8 semanas de edad (Janvier Labs). Distintas cantidades de células (1×10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2) de las líneas de melanoma murino B16F10 sh#NTC y B16F10 silenciadas para la expresión de Loxl3 (shLoxl3#2 y shLoxl3#3), resuspendidas en 30 μ L de medio de cultivo, se inyectaron subcutáneamente en los flancos (la misma línea celular en ambos flancos de cada animal). Se evaluó el crecimiento de los tumores formados midiendo semanalmente su tamaño con un calibre, calculando el volumen tumoral según la fórmula:

$$V = diagonal\ mayor \times diagonal\ menor^2 \times \frac{\pi}{6}$$

Los animales fueron sacrificados cuando la diagonal mayor de alguno de los tumores alcanzaba 1,5 cm, cuando los tumores se ulceraban o si los animales presentaban signos de sufrimiento. En ese momento, todos los animales de la misma condición experimental eran sacrificados.

4.3. Ensayos de metástasis experimental

Se inyectaron 1×10^5 células B16F10 control (pLKO-NTC) o silenciadas para Loxl3 (pLKO-shLoxl3#2 y pLKO-shLOXL3#3), en un volumen final de 100 μ L en la vena de la cola de ratonas C57BL/6JRj de 8 semanas de edad (Janvier Labs). Los animales fueron sacrificados a los 15 días post-inyección y se extrajeron los pulmones para evaluar la presencia de metástasis, mediante tinciones de hematoxilina-eosina tras ser fijados en PFA al 4 % en PBS y embebidos en parafina (ver sección 5.1).

4.4. Extracción de embriones en distintos estadios del desarrollo embrionario

Tras evaluar la presencia de tapón vaginal en las hembras después de establecer los cruces de interés, se extrajeron los embriones en los estadios de desarrollo objeto de estudio y se genotiparon. Para su conservación, los embriones eran fijados en PFA al 4 % en PBS y mantenidos en rotación durante toda la noche a 4 °C. Tras lavarlos con PBS y posteriormente con etanol 50 % en agua a temperatura ambiente durante 90 min se almacenaron en etanol 70 % en PBS a 4 °C.

4.5. Sacrificio de los animales

Los animales eran sacrificados en una cámara de CO₂. Posteriormente, se realizaba la necropsia para obtener embriones de los diferentes estadios o los diferentes tejidos u órganos según se explica para cada experimento.

5. Procesamiento de tejidos, tumores y ganglios linfáticos

5.1. Preparación de bloques de parafina

Los órganos, tumores y ganglios linfáticos provenientes de los ratones de diferentes grupos experimentales se fijaron en PFA al 4% en PBS durante 24 h, siendo posteriormente deshidratados en incubaciones escalonadas de 30 min en etanol 25 %, 50 %, 75 %, 80 % y 100 % y finalmente se incubaron en xilol (Merck) durante 24 h. Las muestras se incluyeron en un baño de xilol y parafina (1:1) a 55 °C durante 16 h. A continuación, se embebieron en parafina (DC Panreac) a 55 °C y los bloques se dejaron enfriar hasta su solidificación. Una

vez obtenidos los bloques, se cortaron en secciones de 4 μm con un microtomo (Microtomo Rotatorio Minot, Leica) y se depositaron sobre portaobjetos tratados con poly-L lisina (Thermo Scientific) para su posterior análisis.

5.2. Tinción de hematoxilina-eosina

Se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina estándar eliminando la parafina sobrante, rehidratando posteriormente, realizando la tinción con hematoxilina y contratinción con eosina para acabar deshidratando y montando con medio de montaje (Moreno-Bueno et al., 2009).

6. Detección de proteínas

6.1. Análisis de proteínas mediante *western blot*

Los extractos proteicos procedentes de cultivos celulares se obtuvieron incubando las células durante 20 min en tampón RIPA (0,1 % SDS, 0,5 % deoxicolato sódico, 1 % NP-40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,0) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (2 mM PMSF, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptina, 20 ng/mL aprotinina, 1 mM ortovanadato) (Sigma). En el caso de tejidos, las muestras fueron antes machacadas en un mortero sobre nieve carbónica hasta obtener el polvo del tejido que fue triturado con un homogeneizador (Polytron PT 1200 E, Kinematica). En ambos casos fueron después centrifugados durante 20-30 min a 13.000 rpm a 4 °C y el sobrenadante, conteniendo las proteínas, se aisló para la evaluación de la concentración proteica mediante un ensayo de BCA (*bicinchoninic acid assay*) (Thermo Scientific). Las muestras cuantificadas fueron almacenadas a -80 °C hasta su uso.

Entre 30 y 50 μg de los diferentes extractos proteicos a los que se añadió buffer Laemmli se resolvieron en geles desnaturalizantes SDS-PAGE de poliacrilamida (concentración 6-15 % en función del peso molecular de las proteínas de interés). Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham) utilizando tampón de transferencia (10 % metanol, 10 % Tris-glicina pH 8,8) durante 2 h a 100 V. Se comprobó la

transferencia correcta de las proteínas mediante la incubación durante 2 min en solución Ponceau S (Sigma). Después de lavar la membrana, la unión inespecífica de anticuerpos se bloqueó mediante incubación de 1 h a temperatura ambiente con tampón TBS (tampón salino Tris: 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl) conteniendo 0,01 % Tween (TTBS) y 5 % de leche desnatada. Las membranas se incubaron tras el bloqueo con los anticuerpos primarios correspondientes (Tabla 9) disueltos en 5 % leche en TTBS durante toda la noche a 4°C. Tras tres lavados de 10 min en TTBS, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 10) durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas fueron lavadas 3 veces en TTBS y las proteínas se visualizaron mediante quimioluminiscencia usando el kit de detección *Western Lightning Plus-ECL* (PerkinElmer) tras 1 min de incubación y su posterior exposición y revelado utilizando películas de radiografía. En todos los casos, los resultados mostrados corresponden a un experimento representativo de, al menos, 3 experimentos independientes.

Tabla 9. Anticuerpos primarios.

Proteína	Especie (tipo)	Procedencia	Dilución WB/IHQ	Referencia (nº catálogo)
GAPDH	Ratón (mc)	Calbiochem	1:50.000/--	CB1001
LOXL3	Ratón (mc)	Sta. Cruz	1:200/--	SC-377216
S100b	Ratón (mc)	Sta. Cruz	1:500/--	SC-393919
SOX10	Ratón (mc)	Sta. Cruz	1:100/--	SC-365692
SOX10	Cabra (pc)	Sta. Cruz	--/*	SC-17342
α-Tubulina	Ratón (mc)	Sigma	1:5.000/--	T5168
TWIST1	Conejo (pc)	Sta. Cruz	1:200/--	SC-15393
TYRP2	Cabra (pc)	Sta. Cruz	--/*	SC-10451
ZEB1	Conejo (pc)	Sigma	1:1.000/--	SAB2102759

mc: anticuerpo monoclonal, pc: anticuerpo policlonal

*Inmunohistoquímica (IHQ) realizada en el servicio de histopatología del CNIO de acuerdo con sus protocolos.

Tabla 10. Anticuerpos secundarios.

Anticuerpo	Especie	Procedencia	Dilución WB
Anti-conejo-HRP	Burro	GE Healthcare	1:5.000
Anti-ratón-HRP	Oveja	GE Healthcare	1:5.000

6.2. Análisis de proteínas mediante inmunohistoquímica (IHQ)

Las tinciones inmunohistoquímicas de cortes de tejido obtenidos a partir de bloques de parafina con los distintos anticuerpos indicados en la Tabla 9 fueron realizadas por el servicio de histopatología del CNIO, según sus protocolos específicos para cada anticuerpo utilizado (<https://www.cnio.es/investigacion-e-innovacion/servicios/histopatologia/>).

7. Análisis de RNA

7.1. Extracción de RNA total de células y tejidos y síntesis de cDNA

Las células se crecieron en placas p100 hasta una confluencia aproximada del 80 %. Se recogieron en un 1 mL de PBS y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 2 min descartando el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 mL de trizol (Invitrogen).

En el caso de tejidos, las muestras fueron antes machacadas en un mortero sobre nieve carbónica hasta obtener el polvo del tejido que fue triturado con un homogeneizador (Polytron PT 1200 E, Kinematica) y resuspendido en 1mL de trizol incubándolo en ambos casos durante 15 min a temperatura ambiente.

A continuación, se añadieron 200 μ L de cloroformo y se agitó vigorosamente dejando la mezcla 15 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 11.400 rpm durante 15 min a 4°C. Se aisló la fase acuosa superior a la que se le añadieron 360 μ L de etanol puro para precipitar el RNA. A continuación, se utilizó un kit de purificación de RNA (Thermo Scientific) siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Finalmente, la cantidad y calidad del RNA se evaluó en un espectrofotómetro (Nanodrop ND-1000).

Para la síntesis del DNA complementario (cDNA) se retrotranscribieron 2 μ g del RNA total en un volumen total de agua de 10 μ L que se incubó a 70 °C en un termociclador (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems) durante 5 min. Se preparó una mezcla con 7,25 μ L de agua ultrapura miliQ, 5 μ L de Buffer MLV (*Moloney Leukemia Virus*) 5x (Promega), 1 μ L de dNTPs (Bioron), 0,5 μ L de *random hexamers* (Promega), 0,5 μ L de inhibidor de RNAsa (Invitrogen) y 0,75 μ L de retrotranscriptasa MLV (Promega) por reacción de la cual se

añadieron 15 µL a la mezcla RNA/agua y se incubaron durante 1 h a 42 °C. El cDNA fue almacenado a -20 °C hasta su uso.

7.2. Análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

Para la determinación de la expresión génica mediante RT-qPCR se empleó la mezcla comercial *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) y una pareja de oligonucleótidos específicos para los genes de estudio a una concentración de 0,5 µM (Tabla 11). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador *StepOnePlus Real Time PCR system* (Applied Biosystems) utilizando el programa *StepOne Software V2.3*. Cada reacción se llevó a cabo por triplicado a partir de 20 ng de cDNA y las condiciones de reacción fueron las mismas para todos los genes analizados:

Paso 1: 95 °C 10 min

Paso 2: (95 °C 15 s, 60 °C 1 min) 40 ciclos

Paso 3: 95 °C 15 s

Paso 4: 60 °C 1 min, incrementando la temperatura 0,3 °C en cada ciclo hasta alcanzar los 95 °C 15 s, para la determinación de la curva de fusión.

La expresión génica relativa se calculó mediante el método $2(-\Delta\Delta Ct)$, determinando el número de copias del gen de interés frente al gen de expresión constitutiva *β-actina* según la siguiente fórmula:

$$\Delta Ct = 2^{Ct_{control} - Ct_{problema}}$$

Donde ΔCt es la expresión normalizada del gen de interés frente a la expresión del gen constitutivo, Ct es el ciclo umbral, control es el gen de expresión constitutiva y problema el gen de interés.

Tabla 11. Secuencia de los oligonucleótidos usados para en el análisis mediante RT-qPCR.

Gen	Oligonucleótido Fw	Oligonucleótido Rv
<i>β-Actina</i>	GCATGCAGAAGGAGATCACA	TTGTCGATTGTCGTCCTGAG
<i>E-Cadherina</i>	CCCGGGACAATGTGTATTACTATGA	GCAGCTGGCTCAAATCAAAGTCC
<i>MelanA</i>	ATGTGAGAGCCCTGATCACC	CAGCGTTCTCAGGAGTTTCC
<i>Mitf</i>	GGGAACAGCAACGAGCTAAG	TGATGATCCGATTCACCAGA
<i>Snail2</i>	CCTTTCTCTTGCCCTCACTG	ACAGCAGCCAGACTCCTCAT
<i>S100A1</i>	GCCCTTCTGTCGAGAATCTG	CTTGTCCACAGCATCTGCAT
<i>SOX10</i>	TTTGGTGGTGAGGATTGAGG	TCCTGAGGAAGTGGAAAACC
<i>Twist1</i>	CCCCACTTTTGGACGAAGAA	CAGTTTGATCCAGCGTTTT
<i>Tyr</i>	GGGCCCAAATTGTACAGAGA	ATGGGTGTTGACCCATTGTT
<i>Zeb1</i>	GGGGCATCTCACACTTTTGT	AACGGCTGTGAACCAAAAAC
<i>Zeb2</i>	CCACCAGCCCTTTAGGTGTA	CCCTTGTTCTTCTGGCTGAG

8. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 6. En los análisis de contingencia se usó el test de Fisher (*two-sided*). Las curvas de supervivencia se analizaron mediante el test de Mantel-Cox. Para evaluar las diferencias entre dos grupos se usó la prueba t de Student (*two-tailed*). Se consideró significativo un valor $p < 0,05$. El código de significancia estadística utilizado fue el siguiente: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.



RESULTADOS

Resultados

1. Estudio de la implicación de *Lox/3* y *Lox/2* en el desarrollo embrionario

1.1. Análisis del desarrollo embrionario en ratones con delección de *Lox/2* y *Lox/3*

En el laboratorio se generaron los modelos genéticos de delección simple de *Lox/2* (*Lox/2*^{-/-}) y de *Lox/3* (*Lox/3*^{LacZ/LacZ}) (Tabla 1), cuyo estudio determinó que presentaban letalidad perinatal de penetrancia incompleta pero no letalidad embrionaria asociada a la delección simple de cada gen (Martin et al., 2015, Floristán, 2015). Tras cruzar animales heterocigotos para los dos genes (*Lox/2*^{+/-} X *Lox/3*^{+/-LacZ}) (Fig. 8) y analizar 293 crías no se detectaron animales con el genotipo de doble delección de *Lox/2* y *Lox/3* (*Lox/2*^{-/-}; *Lox/3*^{LacZ/LacZ}; L2-KO/L3-KO) tras el destete (día 21 post-natal) (Floristán, 2015). Por tanto, decidimos analizar las consecuencias de la ausencia conjunta de *Lox/2* y *Lox/3* en distintas etapas embrionarias, para evaluar la importancia de la presencia de ambas lisil oxidasas durante el desarrollo embrionario y una posible compensación de funciones entre ellas. Como se ha comentado, se establecieron cruces entre animales heterocigotos para los dos genes *Lox/2* y *Lox/3* (*Lox/2*^{+/-} X *Lox/3*^{+/-LacZ}) y, tras evaluar la presencia de tapón vaginal en las hembras, se extrajeron y genotiparon los embriones obtenidos en distintos días embrionarios: E13,5 y E9,5. En el estadio E13,5 (Tabla 12) no se obtuvieron embriones con genotipo doble KO (L2-KO/L3-KO). Sin embargo, sí que se obtuvieron embriones con genotipo L2-KO/L3-KO y en la frecuencia esperada en el estadio E9,5 (Tabla 13). En un estudio posterior a un estadio intermedio (E11,5) no se obtuvieron embriones con genotipo L2-KO/L3-KO (Tabla 14), si bien el bajo número de embriones analizados hasta el momento (n=32) no permitió obtener conclusiones firmes. En conjunto, los resultados obtenidos indican que la expresión de *Lox/2* y *Lox/3* es prescindible hasta el estadio E9,5 pero que al menos uno de los dos genes debe expresarse a partir de E9,5 hasta el final del desarrollo embrionario. Los animales con delección simple de cualquiera de los dos genes no presentan letalidad embrionaria sino letalidad perinatal de penetrancia incompleta (Martin et al., 2015, Floristán, 2015) y, sin embargo, la delección simultánea de los dos genes es incompatible con el desarrollo embrionario a partir del estadio E9.5.

RESULTADOS

Tabla 12. Genotipo de los embriones obtenidos a E13,5 a partir de cruces entre parentales heterocigotos *Lox12*^{+/-} X *Lox13*^{+/-}*LacZ*

Genotipo	Obtenidos	Esperados	% Obtenidos	% Esperados
<i>Lox12</i> ^{+/+} ; <i>Lox13</i> ^{+/+}	13	7	11,11	6,25
<i>Lox12</i> ^{+/+} ; <i>Lox13</i> ^{+/-} <i>LacZ</i>	18	15	15,38	12,5
<i>Lox12</i> ^{+/+} ; <i>Lox13</i> ^{LacZ/LacZ}	4	7	3,42	6,25
<i>Lox12</i> ^{+/-} ; <i>Lox13</i> ^{+/+}	19	15	16,24	12,5
<i>Lox12</i> ^{+/-} ; <i>Lox13</i> ^{+/-} <i>LacZ</i>	45	29	38,46	25
<i>Lox12</i> ^{+/-} ; <i>Lox13</i> ^{LacZ/LacZ}	10	15	8,55	12,5
<i>Lox12</i> ^{-/-} ; <i>Lox13</i> ^{+/+}	4	7	3,42	6,25
<i>Lox12</i> ^{-/-} ; <i>Lox13</i> ^{+/-} <i>LacZ</i>	4	15	3,42	12,5
* <i>Lox12</i> ^{-/-} ; <i>Lox13</i> ^{LacZ/LacZ}	0	7	0	6,25
Nº total de embriones analizados	117			

*Genotipo correspondiente a embriones doble KO para *Lox12* y *Lox13*

Tabla 13. Genotipo de los embriones obtenidos a E9,5 a partir de cruces entre parentales heterocigotos *Lox12*^{+/-} X *Lox13*^{+/-}*LacZ*

Genotipo	Obtenidos	Esperados	% Obtenidos	% Esperados
<i>Lox12</i> ^{+/+} ; <i>Lox13</i> ^{+/+}	4	5	4,82	6,25
<i>Lox12</i> ^{+/+} ; <i>Lox13</i> ^{+/-} <i>LacZ</i>	9	10	10,84	12,5
<i>Lox12</i> ^{+/+} ; <i>Lox13</i> ^{LacZ/LacZ}	4	5	4,82	6,25
<i>Lox12</i> ^{+/-} ; <i>Lox13</i> ^{+/+}	12	10	14,46	12,5
<i>Lox12</i> ^{+/-} ; <i>Lox13</i> ^{+/-} <i>LacZ</i>	33	21	39,76	25
<i>Lox12</i> ^{+/-} ; <i>Lox13</i> ^{LacZ/LacZ}	8	10	9,64	12,5
<i>Lox12</i> ^{-/-} ; <i>Lox13</i> ^{+/+}	6	5	7,23	6,25
<i>Lox12</i> ^{-/-} ; <i>Lox13</i> ^{+/-} <i>LacZ</i>	3	10	3,61	12,5
* <i>Lox12</i> ^{-/-} ; <i>Lox13</i> ^{LacZ/LacZ}	4	5	4,82	6,25
Nº total de embriones analizados	83			

*Genotipo correspondiente a embriones doble KO para *Lox12* y *Lox13*

Tabla 14. Genotipo de los embriones obtenidos a E11,5 a partir de cruces entre parentales heterocigotos *Lox12*^{+/-} X *Lox13*^{+/-}*LacZ*

Genotipo	Obtenidos	Esperados	% Obtenidos	% Esperados
<i>Lox12</i> ^{+/+} ; <i>Lox13</i> ^{+/-} <i>LacZ</i>	3	4	9,38	12,5
<i>Lox12</i> ^{+/+} ; <i>Lox13</i> ^{+/+}	4	2	12,5	6,25
<i>Lox12</i> ^{+/+} ; <i>Lox13</i> ^{LacZ/LacZ}	4	2	12,5	6,25
<i>Lox12</i> ^{+/-} ; <i>Lox13</i> ^{+/-} <i>LacZ</i>	9	8	28,13	25
<i>Lox12</i> ^{+/-} ; <i>Lox13</i> ^{+/+}	9	4	28,13	12,5
<i>Lox12</i> ^{+/-} ; <i>Lox13</i> ^{LacZ/LacZ}	2	4	6,25	12,5
<i>Lox12</i> ^{-/-} ; <i>Lox13</i> ^{+/-} <i>LacZ</i>	1	4	3,13	12,5
<i>Lox12</i> ^{-/-} ; <i>Lox13</i> ^{+/+}	0	2	0	6,25
* <i>Lox12</i> ^{-/-} ; <i>Lox13</i> ^{LacZ/LacZ}	0	2	0	6,25
Nº total de embriones analizados	32			

*Genotipo correspondiente a embriones doble KO para *Lox12* y *Lox13*

Aunque los ratones con delección simple de *Lox/2* o *Lox/3* no presentan letalidad embrionaria en los estadios analizados (Tablas 12 y 13) ni en diferentes contextos genéticos hasta el nacimiento (Martin et al., 2015, Floristán, 2015), quisimos analizar la existencia de posibles alteraciones morfológicas en los embriones KO simples de *Lox/2* o *Lox/3*. Para ello se realizó un análisis morfológico inicial de los embriones KO simples obtenidos a E9,5 y E11,5 en cruces entre heterocigotos *Lox/2*^{+/-} y *Lox/3*^{+/*LacZ*}. Como se muestra en la Figura 12, el análisis *de visu* a partir de fotografías de embriones *in toto* no permitió observar diferencias evidentes entre embriones *Lox/2* KO (*Lox/2*^{-/-}; *Lox/3*^{+/+}) o *Lox/3* KO (*Lox/2*^{+/+}; *Lox/3*^{LacZ/LacZ}) respecto a los correspondientes controles silvestre en ninguno de los dos estadios analizados, con excepción de la ausencia de giro en la parte distal de uno de los embriones *Lox/3* KO a E9,5 (Fig. 12, segunda fila imagen central), pendiente de confirmar como fenotipo aislado o habitual.

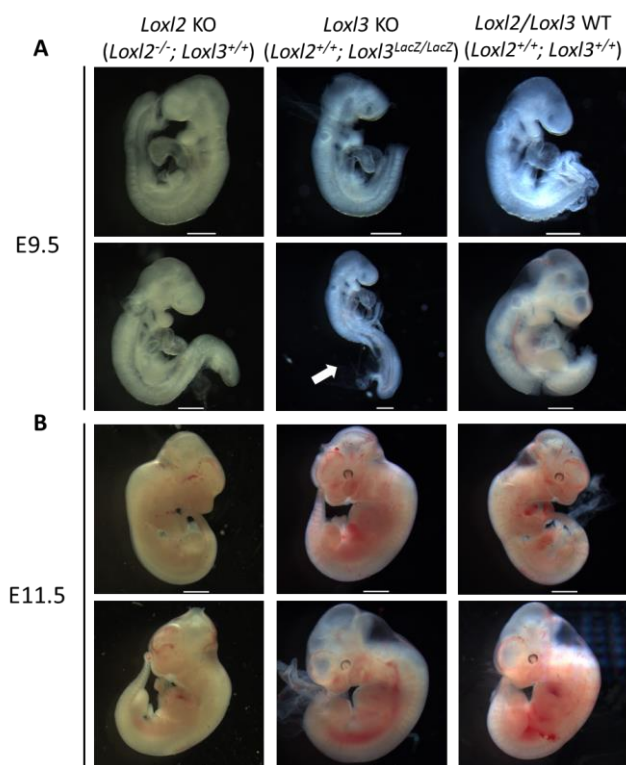


Figura 12. Imágenes representativas de embriones de ratones *Lox/2*^{-/-} o *Lox/3*^{LacZ/LacZ} en estadios E9,5 (A) y E11,5 (B) y los correspondientes controles silvestre para ambos genes. Las imágenes se obtuvieron con una lupa Leica DFC 550, la barra de escala corresponde a 2 mm. Se puede observar la disposición aparentemente anómala de la región distal (flecha blanca) del embrión *Lox/3* KO a E9,5 en el panel central inferior.

1.2. Generación de ratones con sobreexpresión de *Lox/2* y delección de *Lox/3*

Los datos obtenidos tras los cruces entre ratones heterocigotos para *Lox/2* (*Lox/2^{+/-}*) y *Lox/3* (*Lox/3^{+/-}*) sugieren cierta compensación funcional entre ellas durante el desarrollo embrionario a partir de E9,5 (Tablas 12 y 13). Por este motivo, nos planteamos determinar si la sobreexpresión de *Lox/2* podía revertir la alta letalidad perinatal asociada a la delección de *Lox/3*, estimada en el 77,6% ((Floristán, 2015), Tabla 1). Para ello, se cruzaron animales heterocigotos del modelo de sobreexpresión de *Lox/2* (*R26^{+/-}*), generado y caracterizado previamente en el grupo (Tabla 6 y Fig. 9) (Salvador, 2014, Martin et al., 2015), con heterocigotos del modelo KO de *Lox/3* (*Lox/3^{+/-}*) (Fig. 10) hasta obtener animales suficientes para establecer nuevos cruces entre dobles heterocigotos (*R26^{+/-}; Lox/3^{+/-}* X *R26^{+/-}; Lox/3^{+/-}*) cuyas crías se genotiparon tras el destete (día 21 post-natal). Según datos previos del laboratorio, el porcentaje de ratones *Lox/3* KO (*Lox/3^{LacZ/LacZ}*) después del destete tras el cruce entre heterocigotos de este alelo (*Lox/3^{+/-}*) es del 5,6% en vez del 25% esperado según la frecuencia mendeliana (Floristán, 2015). En el caso de los animales *Lox/2* KI, tras el cruce entre parentales heterocigotos (*R26^{+/-}*) nacen animales con la frecuencia mendeliana esperada (Martin et al., 2015).

Tras analizar 150 animales obtenidos del cruce entre dobles heterocigotos para ambos alelos (Tabla 15) no se obtuvieron animales *Lox/3* KO y silvestres para *Lox/2* (*R26^{+/-}; Lox/3^{LacZ/LacZ}*) (Tabla 15), a pesar de esperarse alrededor de 2 animales asumiendo la letalidad perinatal asociada a la delección de *Lox/3*. Sin embargo, al sobreexpresar *Lox/2* bien a partir de un único alelo (*R26^{+/-}; Lox/3^{LacZ/LacZ}*) o de ambos (*R26^{L2/L2}; Lox/3^{LacZ/LacZ}*), se obtienen 19 y 3 animales, respectivamente, con la delección de *Lox/3* (Tabla 15) lo que indica que la sobreexpresión de *Lox/2* rescata la letalidad perinatal observada para los animales con el genotipo *R26^{+/-}; Lox/3^{LacZ/LacZ}*.

Tabla 15. Genotipos obtenidos de los animales analizados al destete tras el cruce $R26^{+/L2}; Loxl3^{+/LacZ}$ X $R26^{+/L2}; Loxl3^{+/LacZ}$

Genotipo	Obtenidos	Esperados	Real esperados*	% Obtenidos	% mendeliano esperado
$R26^{+/+}; Loxl3^{+/+}$	3	9	9	2	6,25
$R26^{+/+}; Loxl3^{+/LacZ}$	11	19	19	7,3	12,5
¹ $R26^{+/+}; Loxl3^{LacZ/LacZ}$	0	9	2	0	6,25
$R26^{+/L2}; Loxl3^{+/+}$	21	19	19	14	12,5
$R26^{+/L2}; Loxl3^{+/LacZ}$	66	38	38	44	25
² $R26^{+/L2}; Loxl3^{LacZ/LacZ}$	19	19	4	12,7	12,5
$R26^{L2/L2}; Loxl3^{+/+}$	19	9	9	12,7	6,25
$R26^{L2/L2}; Loxl3^{+/LacZ}$	8	19	19	5,3	12,5
³ $R26^{L2/L2}; Loxl3^{LacZ/LacZ}$	3	9	2	2	6,25
Total	150				

*Número de ratones esperados asumiendo la letalidad embrionaria asociada a la delección de *Loxl3* según datos previos del laboratorio (Floristán, 2015).

¹Genotipo de animales *Loxl3* KO con expresión *Loxl2* WT

²Genotipo de animales *Loxl3* KO con sobreexpresión de *Loxl2* en heterocigosis.

³Genotipo de animales *Loxl3* KO con sobreexpresión de *Loxl2* en homocigosis.

2. Caracterización de la función de *Loxl3* en líneas celulares de melanoma murino

2.1. Efecto del silenciamiento de *Loxl3* en células de melanoma B16: estudios *in vitro*

2.1.1. Análisis de la proliferación y muerte celular

Los estudios previos del grupo mostraron que LOXL3 era indispensable para la supervivencia de líneas celulares de melanoma humano (Santamaría et al., 2018). Para analizar si la misma dependencia tiene lugar en células de melanoma murino, se usó como modelo la línea celular B16F10, en adelante F10, que corresponde a un clon metastático obtenido a partir de la línea celular de melanoma espontáneo murino B16F0 en ratones C57BL/6Jrj (Fidler, 1973). La línea celular F10 ha perdido la expresión de las proteínas supresoras de tumores p16^{Ink4a} y p19^{Arf} como consecuencia de una delección en el *locus Cdkn2a* (Melnikova et al., 2004).

Se silenció la expresión de *Loxl3* en células F10 mediante infección lentiviral utilizando horquillas cortas de RNA de interferencia (shRNAs clonados en el vector lentiviral pLKO con resistencia a puromicina). Se utilizó un control inespecífico pLKO-NTC (NTC) y dos

interferentes de Loxl3 de ratón: pLKO-shLoxl3#2 (sh2) y pLKO-shLoxl3#3 (sh3) (ver Materiales y Métodos, Tabla 8). Tras la infección de las células F10 y selección en presencia de 1 µg/ml de puromicina, se determinó mediante *western blot* que el silenciamiento de la expresión de Loxl3 se mantenía estable durante al menos 9 semanas (Fig. 13 A), por lo que los experimentos relacionados con estas células se realizaron en un periodo inferior a 9 semanas tras la infección lentiviral, evaluándose siempre el correcto silenciamiento de la expresión de Loxl3.

La interferencia de la expresión de Loxl3 (Fig. 13 A) causó una disminución estadísticamente significativa de la proliferación celular evaluada directamente mediante conteo del número de células (datos no mostrados) e indirectamente utilizando el ensayo de MTT (Fig. 13 B). Sin embargo, no se observaba un aumento en la apoptosis de las células F10, analizada mediante marcaje con anti-Anexina V y yoduro de propidio y cuantificada por citometría de flujo, tras el silenciamiento de Loxl3 (Fig. 13 C). Tampoco en ausencia de Loxl3 se observaron alteraciones en el ciclo celular con respecto a las células control, analizado por citometría de flujo tras 4 días (Fig. 13 D) ni tras 12 días (datos no mostrados) del silenciamiento de Loxl3.

Por tanto, el silenciamiento de la expresión de Loxl3 en la línea F10 ralentiza la proliferación celular, pero no provoca un aumento de muerte celular por apoptosis ni altera sustancialmente la progresión del ciclo celular.

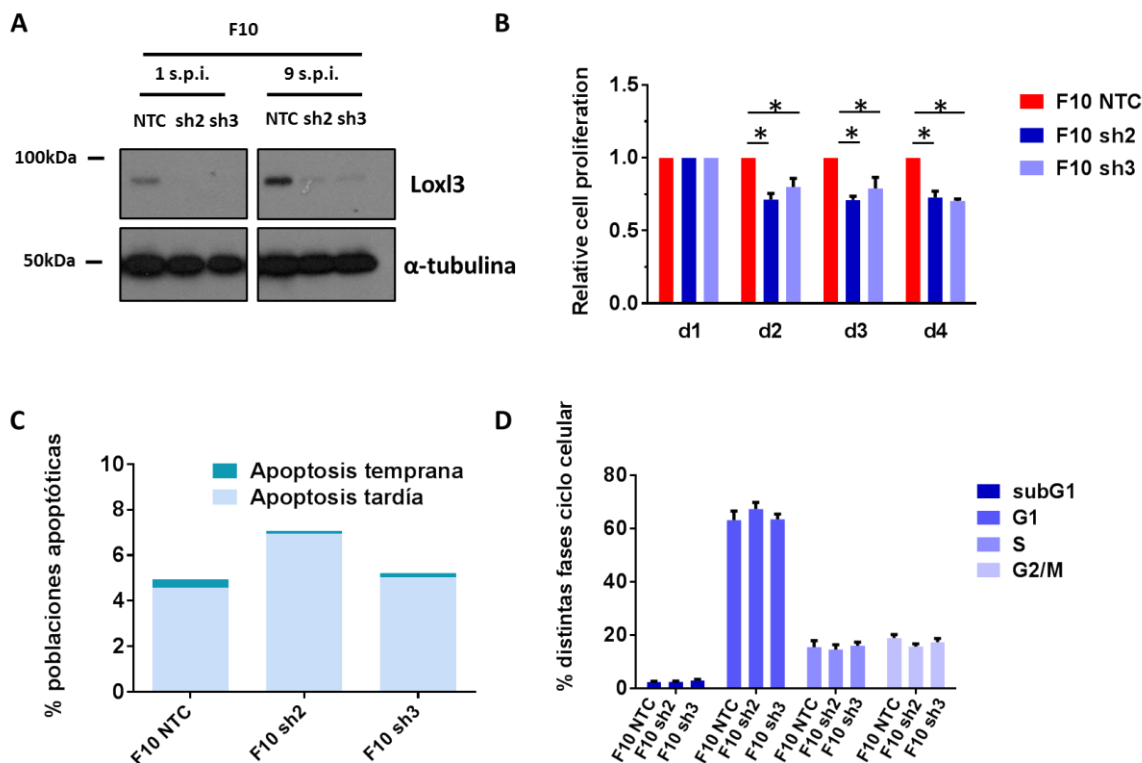


Figura 13. Efecto del silenciamiento de Loxl3 sobre la proliferación, apoptosis y ciclo celular en la línea de melanoma murino B16F10. (A) Comprobación del silenciamiento de la expresión de Loxl3 mediante *western blot* en la línea celular B16F10. Como control de carga se utilizó la detección de α-tubulina; NTC: *non-targeting control*; sh2: shLoxl3#2 y sh3: shLoxl3#3; s.p.i.: semanas post-infección. (B) Evaluación de la tasa de proliferación celular tras el silenciamiento de Loxl3 mediante ensayo de MTT. Se muestra la media de 4 experimentos independientes en células control (NTC) y silenciadas para Loxl3 (sh2 y sh3). d1: día 6 post-infección, análisis de proliferación realizado 24 h tras sembrar las células, d2-d4: días sucesivos tras la siembra. * $p < 0,05$. (C) Análisis de las poblaciones apoptóticas tras la incubación con yoduro de propidio y anti-Anexina V mediante citometría de flujo. Se muestra la media de 3 experimentos independientes a los 4 días tras la infección y silenciamiento de Loxl3 (sh2 y sh3) y en células control (NTC). Las diferencias no fueron significativas. (D) Porcentaje de células en diferentes fases del ciclo celular determinado mediante citometría de flujo 4 días tras la infección y silenciamiento de Loxl3 (sh2 y sh3) y en células control (NTC). Fases: subG1, G1, S y G2/M. Se muestra la media de 5 experimentos con barras del error estándar. Las diferencias no fueron significativas.

2.1.2. Análisis de la capacidad clonogénica y de transformación

Quisimos determinar si, además de la proliferación, el silenciamiento de Loxl3 en células F10 afectaba a su capacidad de formación de colonias de forma dependiente e independiente de anclaje. En un ensayo de clonogenicidad o crecimiento de colonias dependiente de anclaje se observó una disminución significativa en el número de colonias

RESULTADOS

generadas por las células F10 que no expresan Loxl3 (sh2 y sh3) con respecto a las células control F10 NTC (Fig. 14 A). También disminuyó significativamente la capacidad de transformación de las células F10 cuando están silenciadas para la expresión de Loxl3, respecto a células control, como pudo determinarse mediante ensayos de formación de colonias en agar semisólido (Fig. 14 B). Además las colonias generadas por células F10-sh2 y F10-sh3 tienen un menor tamaño que las colonias formadas por las células control F10-NTC (Fig. 14 B y datos no mostrados).

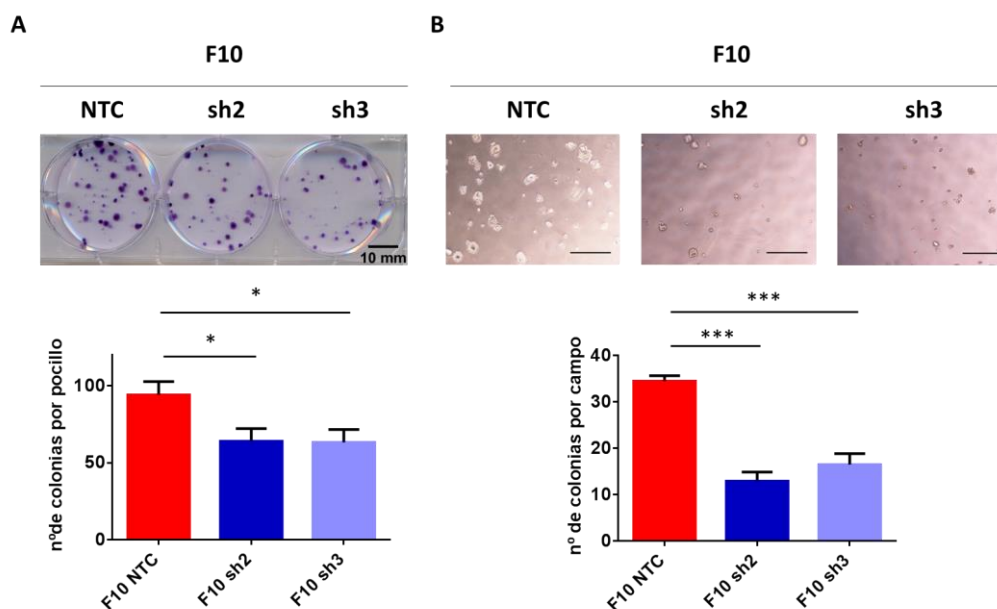


Figura 14. Análisis de la capacidad clonogénica y de transformación de la línea celular B16F10 tras el silenciamiento de la expresión de Loxl3. (A) Imágenes representativas de los ensayos de clonogenicidad (arriba) y gráfica (debajo) donde se indica el número de colonias por pocillo de las líneas F10 NTC, F10 sh2 y F10 sh3. Se muestra la media de los duplicados de 6 experimentos independientes. (B) Imágenes representativas de los ensayos de transformación celular (arriba) (barra de escala, 500 μ m) y gráfica (debajo) indicando el número de colonias por campo de las líneas F10 NTC, F10 sh2 y F10 sh3. Se muestra la media de 4 campos por pocillo de los duplicados de 4 experimentos independientes. Barras, error estándar, * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Puesto que el silenciamiento de la expresión de Loxl3 afecta negativamente a la proliferación celular así como a las propiedades clonogénicas y de transformación de la línea celular F10 de melanoma murino *in vitro*, evaluamos si también tenía consecuencias *in vivo* sobre la capacidad de formación de tumores y de colonización metastática.

2.2. Efecto del silenciamiento de *Lox/3* en células de melanoma B16: estudios *in vivo*

2.2.1. Ensayos de tumorigenicidad

Para estudiar el efecto del silenciamiento de *Lox/3* sobre la capacidad de formación de tumores de las células F10, las células B16F10 control (NTC) y las interferidas para la expresión de *Lox/3* se inyectaron intradérmicamente en los flancos de ratonas C57BL/6JRj de 8 semanas de edad (2×10^5 células por flanco). A pesar de las diferencias en proliferación y formación de colonias determinadas *in vitro*, el silenciamiento de *Lox/3* no afectaba significativamente a la incidencia, latencia ni al crecimiento de tumores *in vivo* (Fig. 15 A y 15 C). Al generarse tumores en prácticamente todos los flancos de los animales tras inyectar 2×10^5 células (Fig. 15 A), que mantenían en su caso el silenciamiento de *Lox/3* (Fig. 15 B), decidimos llevar a cabo experimentos de dilución límite en los que tampoco se observaron diferencias significativas en la tumorigénesis en ninguna de las condiciones ensayadas (10^5 , 10^4 , 10^3 y 10^2 células por flanco) en función de la presencia o ausencia de *Lox/3* (datos no mostrados).

RESULTADOS

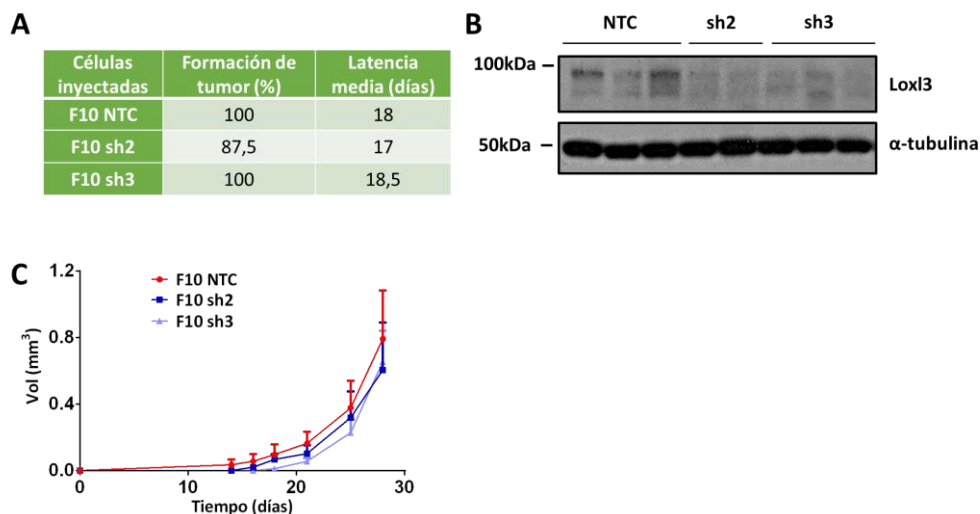


Figura 15. Inyección ortotópica en ratones singénicos de células B16F10 control y silenciadas para la expresión de Loxl3. (A) Tabla resumen que muestra la incidencia de tumores en porcentaje (%) y la latencia media (días transcurridos hasta que los tumores alcanzan el tamaño mínimo para ser medidos) en células control (NTC) y silenciadas para Loxl3 (sh2 y sh3). **(B)** Comprobación por *western blot* del silenciamiento de Loxl3 en los tumores generados; se muestran extractos correspondientes a 3 tumores independientes generados por cada una de las líneas F10 inyectadas (NTC, sh2 y sh3). Se detectó la expresión de α -tubulina como control de carga. **(C)** Volumen de los tumores generados en ambos flancos de ratonas C57BL/6JRj tras la inyección de las células indicadas (2×10^5 células por flanco) a los tiempos indicados. Se muestra la media más el error estándar de 4 animales por condición experimental (8 tumores/ condición). Las diferencias entre los grupos no fueron significativas.

2.2.2. Ensayos de metástasis experimental

La línea celular de melanoma murino B16F10 presenta una alta capacidad metastática en ensayos de metástasis experimental constituyendo un modelo adecuado de melanoma metastático (Fidler, 1973, Melnikova et al., 2004). Puesto que varios miembros de la familia de proteínas lisil oxidasas han sido involucrados en metástasis, en particular LOX y LOXL2 (Erler et al., 2006, Moreno-Bueno et al., 2011, Barker et al., 2012, Cano et al., 2012, Canesin et al., 2015, Trackman, 2016b, Salvador et al., 2017), quisimos determinar el efecto del silenciamiento de la expresión de Loxl3 en las células F10 en la generación de metástasis experimentales. Para ello se inyectaron en la vena de la cola del ratón células F10 control (NTC) e interferidas para Loxl3 (sh2 y sh3) y se evaluó su capacidad metastática en pulmón. El número de focos de metástasis fue evaluado *de visu* y tras teñir con hematoxilina-eosina cortes seriados de los pulmones de ratones inyectados con 1×10^5

células F10 control e interferidas para la expresión de Loxl3. Se observó que el silenciamiento de Loxl3 reduce drásticamente el número de focos metastáticos en pulmón generados por las células F10 (Fig. 16 B, 16 C y 16 D), efecto que parece ser proporcional al grado de silenciamiento de Loxl3 (Fig. 16 A y 16 B).

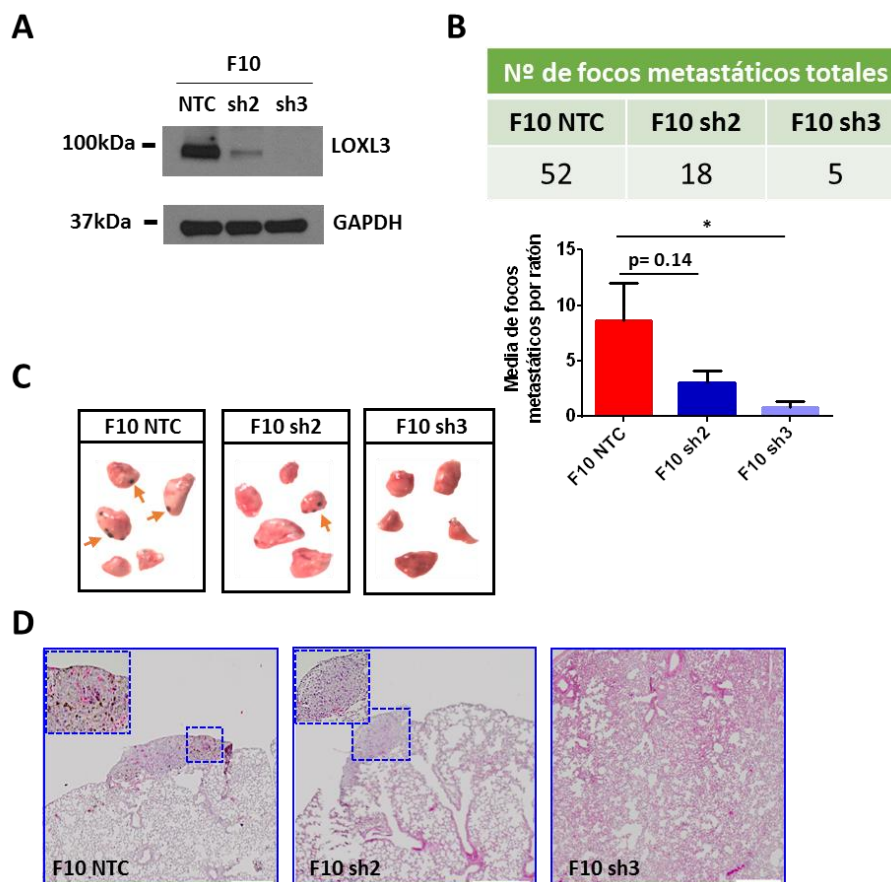


Figura 16. Metástasis experimental de células B16F10 control e interferidas para Loxl3 tras su inyección en la vena de la cola de ratonas C57BL/6JRj. (A) Comprobación del silenciamiento de Loxl3 por *western blot* en las células F10 antes de su inyección, donde se muestran las células control (NTC) e interferidas para Loxl3 (sh2 y sh3). Se detectó la expresión de GAPDH como control de carga. (B) Tabla con la cuantificación del número total de focos de metástasis detectados en secciones teñidas con hematoxilina-eosina de los pulmones embebidos en parafina (n=6 para cada condición) en los que se inyectaron las células mostradas en (A). Debajo se muestra una gráfica con la media del número de focos metastáticos por ratón. Se muestra mediante barras el error estándar, *p<0,05. (C) Imágenes de los lóbulos pulmonares correspondiente a un ratón representativo de cada grupo con las metástasis observadas en los pulmones tras su extracción. Los focos metastáticos se observan como lesiones pigmentadas, algunos de ellos se señalan con flechas. (D) Tinción de hematoxilina-eosina de secciones correspondientes a pulmones representativos de cada grupo experimental. Los recuadros muestran ampliaciones (20x). Barras de escala, 500 μ M.

En conjunto, los resultados obtenidos con las células B16F10 demuestran la implicación de Loxl3 en la capacidad clonogénica y de transformación *in vitro*, así como en la generación de metastásis en pulmón. Sin embargo, Loxl3 no parece tener efecto sobre la capacidad tumorigénica de las células de melanoma murino B16F10, en contraposición a su acción sobre la proliferación *in vitro*.

3. Generación de un modelo de melanoma murino con pérdida de función de Loxl3

3.1. Generación y caracterización molecular del modelo de melanoma murino con delección condicional de *Loxl3*

Con el objetivo de analizar en mayor profundidad la implicación de Loxl3 en la iniciación y progresión del melanoma *in vivo*, decidimos generar un modelo de ratón con pérdida de función de Loxl3 específica en melanoma. Para ello partimos de la línea de ratón transgénica generada en el grupo del Dr. Marcus Bosenberg (Yale University, EEUU): B6.Cg-*Braf*^{tm1Mmcm}, *Pten*^{tm1Hwu} Tg (Tyr-cre/ERT2)13Bos/BosJ, también conocida como *Tyr::CreERT2*; *Braf*^{CA}; *Pten*^{loxP} (ver Materiales y Métodos, Fig. 5) y disponible en Jackson Laboratory. Este es un modelo genético inducible, basado en la activación del oncogén *Braf* y la delección del supresor tumoral *Pten* en melanocitos, que recapitula la biología de la iniciación, progresión y metástasis del melanoma humano (Dankort et al., 2009). El transgén *Tyr::CreERT2* consta de un fragmento de 5.5 kb del promotor de la tirosinasa (*Tyr*) de ratón y otro fragmento de 3.6 kb de una región *enhancer* del gen *Tyr*, específico de melanocitos, que promueven la expresión del gen *CreERT2*. Este codifica una fusión de la proteína recombinasa Cre a un dominio de unión mutante del receptor de estrógenos humano (ER^{T2}). La proteína de fusión sintetizada sólo se trasloca al núcleo en presencia de 4-hidroxitamoxifeno (4-HT), aunque los autores describen que en este modelo se da un 25-50% de melanoma espontáneo debido a la traslocación al núcleo de la proteína de fusión en ausencia de 4-HT (Dankort et al., 2009). En el núcleo de los melanocitos la recombinasa Cre actúa sobre los transgenes *Pten*^{loxP} y *Braf*^{CA}, generando la pérdida del exón 5 en el gen *Pten* y la recombinación en el gen de *Braf* que inserta la mutación activadora V600E (ver Materiales y Métodos Fig. 5).

En definitiva, en los melanocitos de los ratones *Tyr::CreER^{T2}; Bra^f^{CA}; Pten^{loxP}* tratados con 4-HT se produce la pérdida funcional de Pten y la expresión de la proteína oncogénica constitutivamente activa Bra^f^{V600E}. La aplicación tópica de 4-HT en estos animales promueve el desarrollo de lesiones pigmentadas, las cuales progresan a melanoma maligno y generan metástasis en órganos distantes (Dankort et al., 2009).

Ratones de este modelo se cruzaron con la línea de ratón generada previamente en nuestro laboratorio de delección condicional de *Lox13* (*Lox13^{loxP}*) (ver Materiales y Métodos, Fig. 4) (Floristán, 2015), obteniéndose una línea de ratón transgénica (*Tyr::CreER^{T2}; Bra^f^{CA/+}; Pten^{loxP}; Lox13^{loxP}*) que permite la pérdida condicional de la expresión de *Lox13*, junto a la pérdida de *Pten* y la activación de *Braf* en melanocitos. Tras los cruces adecuados (ver Materiales y Métodos Fig. 6), se seleccionaron los ratones con el genotipo de interés (*Tyr::CreER^{T2}; Bra^f^{CA/+}; Pten^{loxP/loxP}; Lox13^{loxP/loxP}*) y los controles correspondientes que portan el alelo *Lox13* WT (*Tyr::CreER^{T2}; Bra^f^{CA/+}; Pten^{loxP/loxP}; Lox13^{+/+}*) y se trataron al mes del nacimiento con 5 µL de 4-HT (2 mg/mL disuelto en etanol 100%) durante 3 días consecutivos en el lomo del animal previa rasuración. Tras la aparición de las lesiones tumorales primarias se analizaron mediante PCR los cambios genéticos en los tres genes susceptibles de sufrir recombinación por la acción de la recombinasa Cre en las lesiones tumorales y en la cola del ratón (Fig. 17). Como se puede observar, el 4-HT actúa localmente sobre los melanocitos exclusivamente en la zona de administración (tumor generado en el lomo) ya que en los melanocitos de la cola, que expresan la recombinasa Cre y los alelos que contienen las secuencias *loxP*, no se dan los cambios genéticos asociados (Fig.17). El tamaño de los productos de PCR de los transgenes *Braf*, *Pten* y *Lox13* varía de acuerdo con lo esperado una vez que se han producido las recombinaciones génicas mediadas por Cre en las lesiones tumorales. Así, en las lesiones se pueden detectar fragmentos de DNA de los dos alelos de *Braf* (*Braf^{V600E}* y *Braf^{WT}*) como corresponde al estar en heterocigosis el alelo modificado (*Braf^{CA/+}*), mientras que se detectan los fragmentos correspondientes a la delección en homocigosis de los transgenes *Pten* y *Lox13* (Fig. 17, panel derecho, comparar carril con la muestra de un tumor con el correspondiente a la muestra de la cola del ratón).

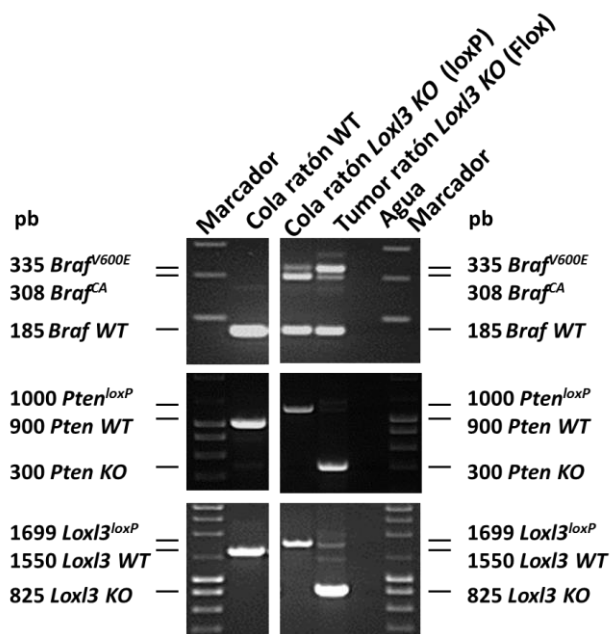


Figura 17. Comprobación mediante PCR de los cambios genéticos producidos por la recombinasa Cre en DNA genómico. Análisis por PCR de los genes *Braf*, *Pten* y *Loxl3* en la cola de un ratón WT (*Braf*^{+/+}; *Pten*^{+/+}; *Loxl3*^{+/+}) (panel izquierdo), así como en la cola y en un tumor generado en un ratón *Loxl3* KO condicional (*Braf*^{CA/+}; *Pten*^{loxP/loxP}; *Loxl3*^{loxP/loxP}) tras la administración tópica de 4-HT (panel derecho). El tamaño esperado de los diferentes productos de PCR de los alelos correspondientes en pares de bases (pb) se indica delante de cada gen a la derecha e izquierda de los dos paneles de la imagen. Los carriles de ambos extremos contienen los marcadores de DNA. En el panel derecho el carril de agua corresponde a un control negativo en el que no se ha añadido DNA a la mezcla de reacción de PCR. V600E: alelo con la modificación *Braf*^{V600E}, CA: *Cre-activated Braf*^{V600E}, WT: alelo *wild type* o silvestre, *loxP*: alelo con las secuencias *loxP*, *Flox*=*Loxl3*-KO alelo generado tras la actuación de la Cre recombinasa sobre los sitios *loxP*.

Este análisis confirmó que se generaban las recombinaciones esperadas en los tres genes de interés (activación de *Braf* y delección de *Loxl3* y *Pten*) tras el tratamiento tópico con 4-HT validando la utilización de este modelo genético de melanoma para el estudio de la implicación de *Loxl3* en esta neoplasia.

3.2. Caracterización fenotípica del modelo de melanoma murino con delección condicional de *Loxl3*

A continuación se procedió a la caracterización fenotípica e histológica de las lesiones generadas a partir de melanocitos con expresión de *Loxl3* y de su progresión tumoral. En los animales *Loxl3* WT (*Tyr::CreER*^{T2}; *Braf*^{V600E/+}; *Pten*^{loxP/loxP}; *Loxl3*^{+/+}) las lesiones

iniciales aparecían en torno a los 20-25 días tras la aplicación de 4-HT en el lomo de los animales y eran consistentes con lunares o *nevi* superficiales (Fig. 18 A), similares a los observados en humanos. Estos *nevi* progresaban mediante crecimiento radial en número y pigmentación en la zona tratada hasta fusionarse en una amplia lesión pigmentada, que denominamos tumor primario, con crecimiento vertical aproximadamente a los 35-45 días tras el tratamiento (Fig. 18 A). El análisis histológico de las lesiones mostró que los tumores primarios se localizan en la interfase dermis-epidermis (Fig. 18 B), siendo reminiscentes histológicamente del melanoma desmoplástico humano (Massi and LeBoit, 2014). El origen melanocítico de las lesiones primarias, además de por su intensa pigmentación melanocítica, se confirmó mediante tinciones inmunohistoquímicas de secciones de tumores embebidos en parafina con marcadores específicos de melanocitos como Tyrp2 (*Tyrosinase-related protein 2*), proteína que participa en la vía de biosíntesis de la melanina (Lai et al., 2017) (Fig. 18 C).

Al realizar las necropsias de los ratones tratados, observamos que numerosos ganglios linfáticos, tanto regionales como distales, presentaban pigmentación correspondiente a melanina e inflamación. Asimismo, se encontraron lesiones en pulmón similares a las descritas por otros autores como focos metastáticos de los melanomas primarios (Cesarini et al., 2017, Vitiello et al., 2019). Ambas características de este modelo se analizaron y se presentarán más adelante.

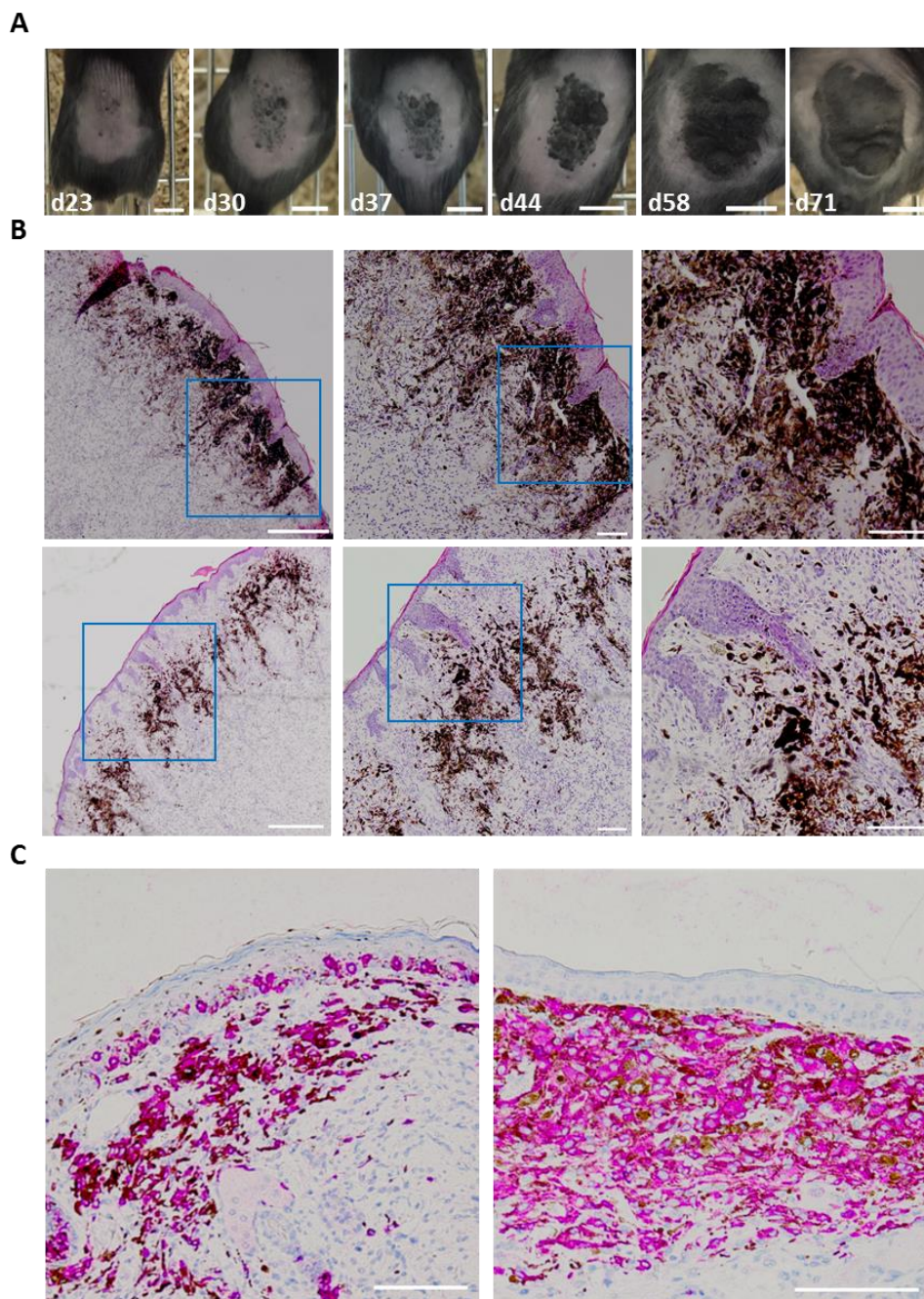


Figura 18. Caracterización fenotípica e inmunohistológica del modelo genético de melanoma con expresión de *Loxl3*. (A) Imágenes representativas de las lesiones iniciales y de su progresión tumoral en ratones *Braf/Pten* control (*Loxl3* WT). Las imágenes se tomaron a los días indicados tras el tratamiento tópico con 4-HT. Barras de escala, 1 cm. (B) Tinciones de hematoxilina-eosina de tumores primarios. En cada fila se muestra un mismo tumor primario con distintos aumentos; la región ampliada en cada caso se indica con un recuadro negro. Barras de escala, 500 μ m (izquierda) y 100 μ m (centro y derecha). (C) Imágenes de tinciones inmunohistoquímicas frente a *Tyrp2* (tinción citoplásmica positiva en color morado) de dos tumores primarios representativos. Barra de escala, 100 μ m.

3.3. Implicación de *Loxl3* en la melanomagénesis y la supervivencia

Para determinar si la ausencia de *Loxl3* en el contexto del modelo *Braf*/*Pten* de melanoma (caracterizado en los apartados anteriores 3.1 y 3.2) afectaba a la aparición y/o progresión de las lesiones pigmentadas, 37 animales *Loxl3* WT y 22 animales *Loxl3* KO de un mes de edad se trataron con 4-HT y se analizó el tiempo que tardaban en aparecer las lesiones iniciales (tiempo libre de lesiones) así como el crecimiento de las mismas a lo largo del tiempo en ambos grupos experimentales. Como se puede observar en la Figura 19 A, en ausencia de *Loxl3* en melanocitos, la aparición de las lesiones iniciales tras el tratamiento con 4-HT se veía significativamente retrasada respecto a las lesiones generadas en animales control (*Loxl3* WT) (Fig. 19 A), determinándose una latencia media de 21 días en los ratones *Loxl3* KO frente a 14 días para los animales *Loxl3* WT. La medida del área de las lesiones en función del tiempo permitió además determinar que en ausencia de *Loxl3* el crecimiento de las mismas es significativamente menor respecto al crecimiento de las lesiones en ratones control que mantienen la expresión de *Loxl3* (Fig. 19 B).

Se registró también la supervivencia global de los ratones de los dos grupos experimentales (*Loxl3* WT y *Loxl3* KO), entendida como el tiempo transcurrido tras la aplicación de 4-HT hasta que los animales debían ser sacrificados bien porque la lesión tumoral presentaba una extensión superficial ≥ 2 cm de diámetro o ulceración del mismo, o por los criterios de punto final establecidos en el protocolo de ética experimental aprobado. De forma relevante, se observó un incremento significativo en la supervivencia de los ratones *Loxl3* KO que carecían de expresión de *Loxl3* en las lesiones melanocíticas respecto a la de los ratones control *Loxl3* WT (Fig. 20).

RESULTADOS

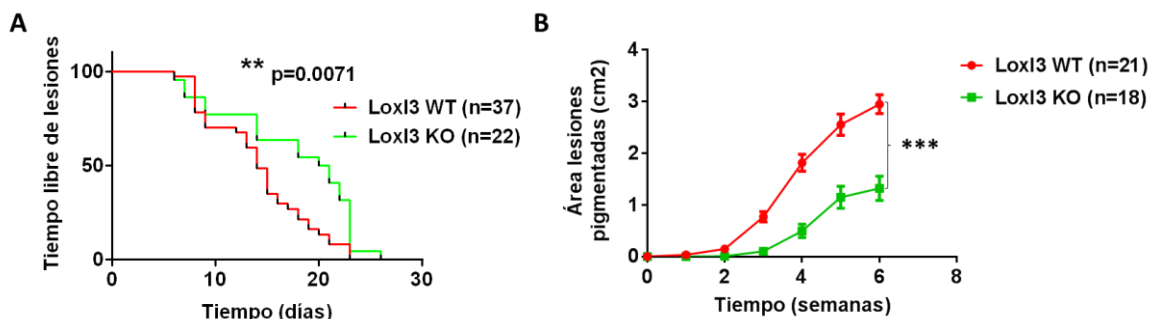


Figura 19. Estudio de la aparición y crecimiento de las lesiones pigmentadas en ratones del modelo genético de melanoma en presencia o ausencia de *Loxl3*. (A) Curva de Kaplan-Meier que muestra el porcentaje de animales libres de lesiones pigmentadas en función del tiempo tras el tratamiento con 4-HT y en ausencia (*Loxl3* KO; n=22) o presencia de *Loxl3* (*Loxl3* WT; n=37). **p<0,01. (B) Curva de progresión de la melanomagénesis a lo largo del tiempo en ratones *Loxl3* WT (n=21) y *Loxl3* KO (n=18), estimada en función de la superficie tumoral (en cm²), tras el tratamiento con 4-HT. ***p<0,001.

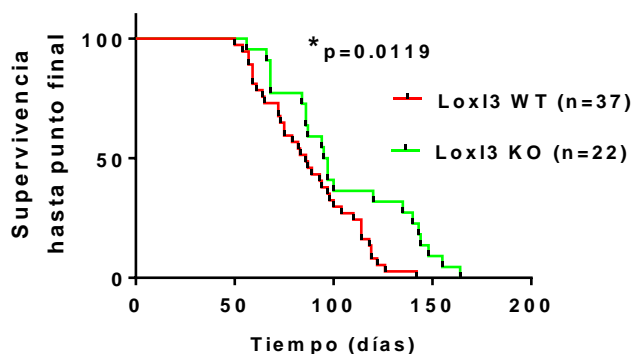


Figura 20. Estudio de la supervivencia global de los ratones del modelo genético de melanoma en presencia o ausencia de *Loxl3*. Curva de Kaplan-Meier de la supervivencia global de ratones *Loxl3* WT (n= 37) y *Loxl3* KO (n = 22) tras el tratamiento con 4-HT. *p<0,05.

En conjunto, estos resultados muestran que la eliminación de *Loxl3* en melanocitos en el contexto del modelo *Braf/Pten* reduce la melanomagénesis, y en consecuencia la mortalidad asociada a la progresión de las lesiones en este modelo. Por tanto, estos datos confirman que *Loxl3* está implicada de forma relevante en la generación y progresión del melanoma murino.

3.4. Implicación de *Lox/3* en la progresión metastática del melanoma murino: metástasis linfática

La diseminación de células melanocíticas observada en los ganglios linfáticos de los ratones tratados con 4-HT y analizados a término, nos llevó a estudiar en mayor detalle el efecto de la ausencia de *Lox/3* en el tumor primario sobre la metástasis linfática. Para ello se diseñó un experimento en el que tanto los animales *Lox/3* WT como *Lox/3* KO se sacrificaron a la vez, exactamente a los 42 días (6 semanas), tras el tratamiento con 4-HT. En ratón se han descrito hasta 22 ganglios linfáticos distintos en la cepa BALB/c (Van den Broeck et al., 2006). En nuestro caso, decidimos evaluar la diseminación desde el tumor primario a los ganglios regionales proximales donde drena el tumor (ganglios linfáticos subilíacos) y a ganglios distales, alejados del tumor primario (ganglios linfáticos parotídeos superficiales) (ver Materiales y Métodos, Fig. 11).

Tras la necropsia de los ratones de ambos genotipos, se analizó visualmente la colonización de los ganglios subilíacos y de los ganglios parotídeos superficiales en base a su pigmentación por melanina. El examen visual indicó que la diseminación a ganglios subilíacos (proximales) de las células de melanoma era menor en ausencia de *Lox/3*, tanto en número de ratones afectados como en tamaño de los ganglios pigmentados, siendo las diferencias respecto a los animales control estadísticamente significativas (Fig. 21 A y B). Además, las diferencias en la diseminación a ganglios distales entre los dos grupos experimentales resultaron mucho más significativas, siendo considerablemente menor el número de ganglios distales pigmentados detectados en los ratones con tumores primarios con delección de *Lox/3* (KO) que en los ratones control con tumores que mantienen la expresión de *Lox/3* (WT) (Fig. 21 A). Además, el grado de pigmentación de los ganglios distales de los ratones *Lox/3* KO era claramente inferior al observado en los ratones control *Lox/3* WT, y muy similar al de los ganglios de ratones control no tratados, que de hecho no presentan pigmentación (Fig. 21 B).

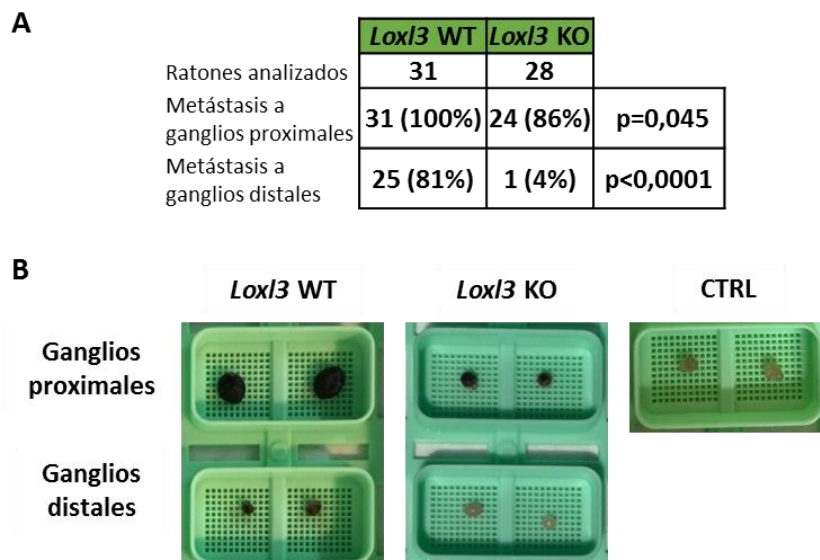


Figura 21. Análisis de la diseminación metastática de las células del melanoma primario a ganglios linfáticos regionales y distales. (A) Análisis del número de animales que presentaban ganglios pigmentados proximales (ganglios subilíacos) y distales (ganglios superficiales parotídeos) en números absolutos y porcentaje. El análisis estadístico se realizó mediante test de Fisher, indicando el p valor. **(B)** Imágenes representativas de los ganglios extraídos de animales con melanomas tanto de ratones control (*Lox13* WT), como de animales con delección de *Lox13* (*Lox13* KO) además de animales control sin tratar con 4-HT (sin tumor primario) de la misma edad (CTRL). Se puede observar las diferencias de tamaño de los ganglios proximales y del grado de pigmentación de los ganglios distales entre los dos grupos experimentales.

La caracterización histopatológica de los ganglios subilíacos de ratones control (*Lox13* WT) permitió establecer que los focos metastáticos linfáticos observados en las tinciones de hematoxilina-eosina (Fig. 22 A) eran de origen melanocítico, siendo positivos para la expresión de marcadores de linaje melanocítico, como *Tyrp2* y *Sox10*, factor de transcripción clave en la diferenciación de los melanocitos (Fig. 22 B) (Willis et al., 2015, Lai et al., 2017).

Las diferencias en la diseminación linfática de las lesiones melanocíticas en función de la expresión de *Lox13* determinadas visualmente (Fig. 21), se confirmaron mediante la detección inmunohistoquímica de *Tyrp2* en secciones de ganglios subilíacos provenientes de los dos grupos experimentales. Se pudo observar una marcada disminución de células de origen melanocítico presentes en los ganglios de ratones con delección de *Lox13* en melanocitos (*Lox13* KO) respecto a los ganglios de ratones control con expresión de *Lox13* (*Lox13* WT) (Fig. 23).

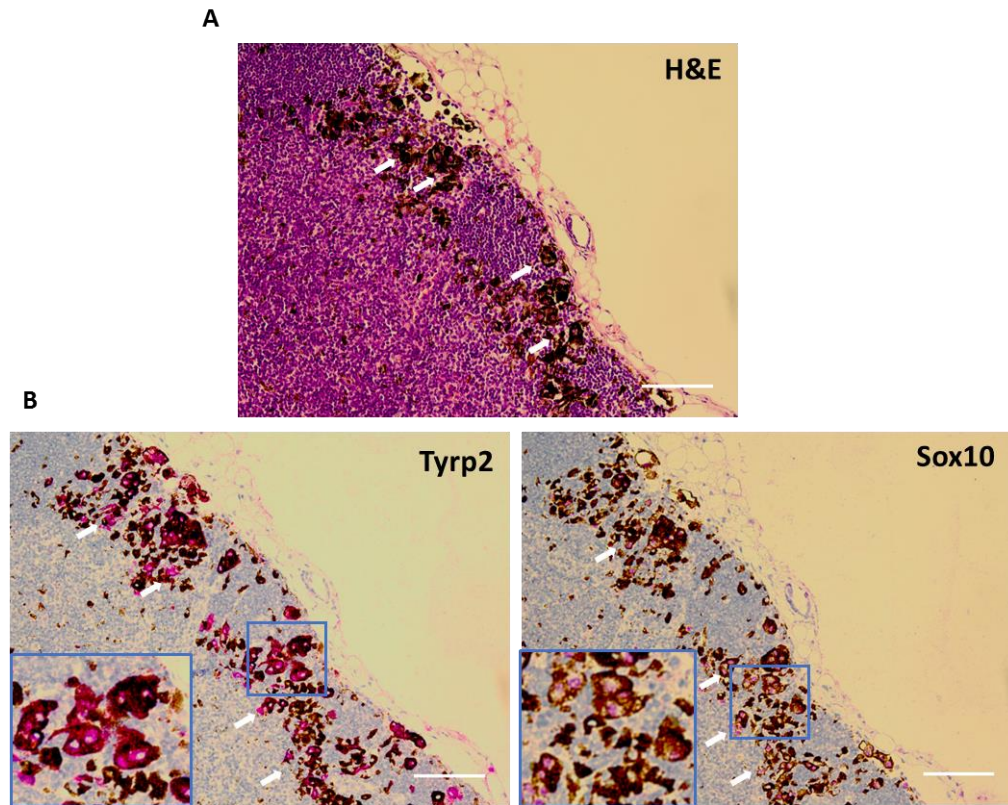


Figura 22. Análisis inmunohistológico de la diseminación metastática de las células del melanoma primario a ganglios linfáticos regionales y distales en ratones *Lox/3* WT. (A) Tinción de hematoxilina-eosina de una sección de un ganglio subilíaco representativo de un ratón control con focos metastáticos de origen melanocítico (flechas). **(B)** Análisis inmunohistoquímico de los marcadores de linaje melanocítico Tyrp2 (Izquierda) y Sox10 (derecha) del ganglio subilíaco proveniente de un ratón *Lox/3* WT mostrado en (A). La tinción morada corresponde a la detección de Tyrp2 (citoplásmica) o de Sox10 (nuclear) y se indica con flechas blancas. Se muestran aumentadas las regiones indicadas por recuadrados. Barras de escala, 100 μ m.

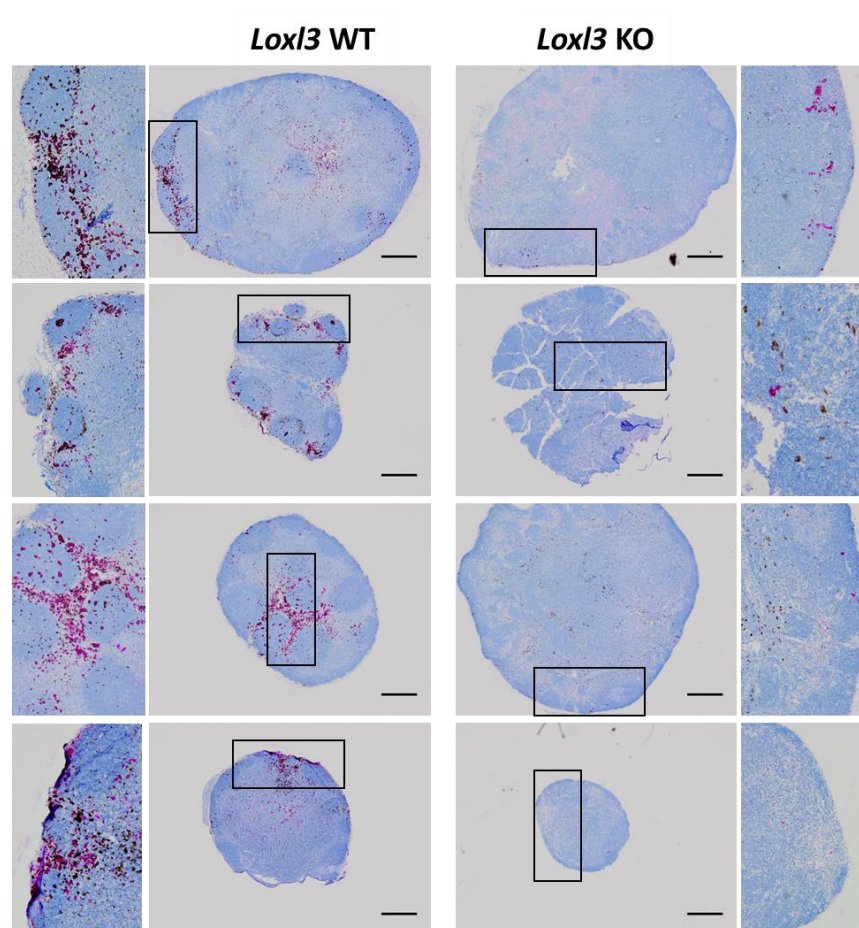


Figura 23. Análisis de la diseminación metastática de melanomas primarios a ganglios linfáticos. Análisis inmunohistoquímico frente a Tyrp2 (positivo en morado) en ganglios subilíacos representativos provenientes de animales control (*Lox13* WT) (dos paneles izquierdos) o de ratones con delección de *Lox13* (KO) (dos paneles derechos) que presentaban melanomas tras el tratamiento con 4-HT. Se muestran los ganglios correspondientes a 4 animales independientes de cada grupo experimental. Barras de escala, 200 μ m (4x). En los paneles de los extremos derecho e izquierdo se muestran ampliaciones 10x de las zonas indicadas mediante recuadros negros en los ganglios correspondientes. Nótese que, en algunos casos, las ampliaciones se han girado 90 ° respecto a la imagen original.

Para caracterizar en mayor detalle si la presencia de *Lox13* favorece la diseminación linfática de las células de melanoma, se analizó en primer lugar el nivel de expresión de varios marcadores de linaje melanocítico en los ganglios linfáticos subilíacos extraídos de los dos grupos de ratones experimentales, como medida indirecta de la cantidad de células provenientes del melanoma primario y por tanto de su capacidad de diseminación metastática. De hecho, se observó una mayor expresión de todos los marcadores de linaje melanocítico (*Tyr*, *S100A1*, *Sox10*, *melan-A*) (Perez-Guijarro et al., 2017) analizados

mediante RT-qPCR en ganglios subilíacos de ratones del grupo control *Lox/3* WT respecto al grupo *Lox/3* KO, sin resultar estadísticamente significativo (Fig. 24 A). Las diferencias de expresión entre los dos grupos se confirmaron a nivel de proteína para alguno de los marcadores, como Sox10 y S100b (Fig. 24 B).

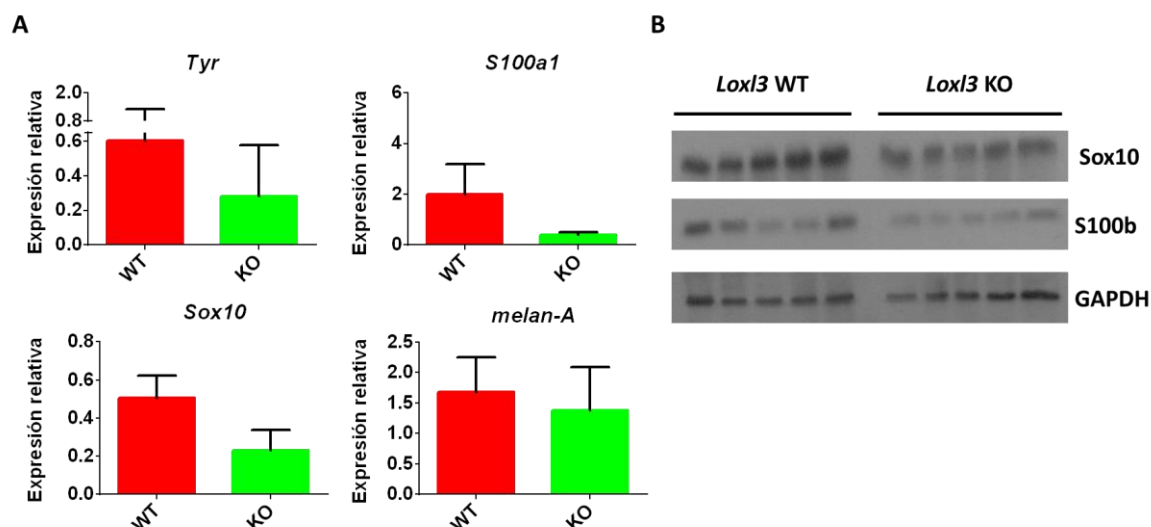


Figura 24. Análisis de la expresión de marcadores de linaje melanocítico en ganglios linfáticos subilíacos. (A) Análisis mediante RT-qPCR de marcadores de linaje melanocítico (*Tyr*, *S100a1*, *Sox10*, *melan-A*) a partir de RNA extraído de ganglios linfáticos subilíacos de animales con expresión de *Lox/3* (WT, n=4) o con delección de *Lox/3* en melanocitos (KO, n=4). Las diferencias no resultaron significativas, $p > 0,05$. (B) Análisis mediante *western blot* de los marcadores de linaje melanocítico Sox10 y S100b en extractos proteicos de ganglios linfáticos subilíacos de animales *Lox/3* WT (n=5) y *Lox/3* KO (n=5). Se detectó la expresión de GAPDH como control de carga.

En conjunto, estos resultados refuerzan el hecho de que *Lox/3* tiene una función crítica en la progresión del melanoma puesto que confiere capacidad de diseminación de las células del melanoma a ganglios linfáticos, siendo su presencia fundamental para que éstas lleguen a los ganglios linfáticos distales.

3.5. Estudio de la capacidad de metástasis a órganos vitales: metástasis pulmonar

En el modelo genético de melanoma (*Tyr::CreER^{T2}*; *Braf^{V600E/+}*; *Pten^{loxP/loxP}*), utilizado durante el desarrollo de esta tesis para introducir la delección condicional de *Lox/3*, se describió originalmente la presencia de focos metastáticos en los pulmones de los ratones tras tratar simultáneamente con 4-HT en oreja, flanco y cola (Dankort et al., 2009).

Posteriormente, otros autores utilizando modelos genéticos basados en el modelo de melanoma de Dankort y Bosenberg también han descrito la presencia de metástasis pulmonares sin pigmentación tras el tratamiento local en el lomo del animal (Cesarini et al., 2017, Vitiello et al., 2019). Considerando estos antecedentes, procedimos a analizar la influencia de la delección de *Lox/3* en los melanomas primarios en la generación de metástasis pulmonares en ratones analizados tras ser sacrificados por los criterios de punto final establecidos (entre 90-160 días tras el tratamiento con 4-HT, apartado 3.3, Fig. 20). En nuestro caso, no observamos lesiones pigmentadas en los pulmones de los animales control (*Lox/3* WT) ni sin *Lox/3* (*Lox/3* KO), aunque sí se detectaron lesiones pulmonares, sin diferencias significativas entre ambos grupos de animales (Fig. 25 A). La caracterización histológica de las lesiones, mostró que presentaban una morfología que se asemeja más a un adenoma pulmonar que a focos metastáticos de origen melanocítico (Fig. 25 B, izquierda). Además, la tinción inmunohistoquímica frente a Sox10 resultó negativa (Fig. 25 B, derecha), en contraposición a la tinción de Sox10 observada en ganglios linfáticos subilíacos analizados en paralelo como control positivo (Fig. 25 C, ver también Fig. 22B).

En base a estos resultados, se puede concluir que las lesiones pulmonares detectadas no son de origen melanocítico, y que su incidencia no se ve afectada por la ausencia de *Lox/3* en el melanoma primario.

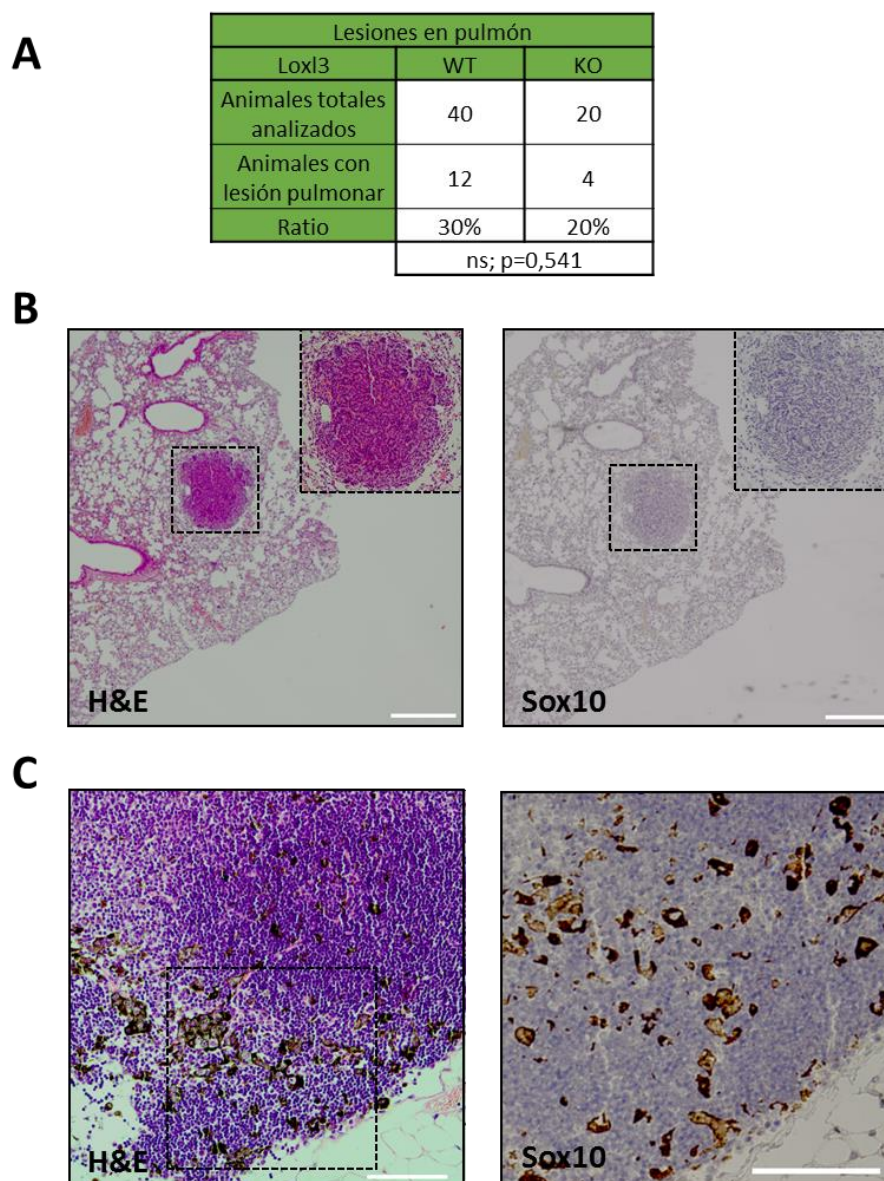


Figura 25. Caracterización de las lesiones pulmonares detectadas en el modelo de melanoma genético murino. (A) Tabla resumen de la incidencia de las lesiones pulmonares en animales *Lox13* WT y *Lox13* KO tratados con 4-HT y analizados 90-160 días post-tratamiento. El análisis estadístico se realizó por test de Fisher; ns, no significativo. **(B)** Izquierda, tinción de hematoxilina-eosina (H&E) de una sección de una lesión pulmonar representativa proveniente de un ratón control (*Lox13* WT) donde se observa una morfología similar a la de un adenoma pulmonar; derecha, tinción inmunohistoquímica frente a Sox10 de una sección de la misma lesión pulmonar donde no se observa tinción. Barras de escala, 500 μ m. Se muestran aumentos 20x de las lesiones pulmonares indicadas por recuadros azules. **(C)** Control positivo para la detección nuclear de Sox10 (derecha) mediante inmunohistoquímica en una sección de un ganglio linfático colonizado por células melanocíticas y su correspondiente tinción de hematoxilina-eosina (izquierda) donde se muestran los focos pigmentados. Se muestra en la inmunohistoquímica de Sox10 el aumento representado por el recuadro en la tinción de hematoxilina-eosina. Barras de escala, 100 μ m.

3.6. Efecto de la delección de *Lox13* en la expresión de marcadores de plasticidad celular en tumores primarios y metástasis linfáticas

A continuación, caracterizamos el efecto de la delección de *Lox13* sobre la expresión de distintos marcadores de linaje melanocítico y de plasticidad celular en muestras de tumores primarios e, inicialmente, de ganglios linfáticos subilíacos de los ratones objeto de estudio.

Como se ha comentado en la Introducción (apartado 2.1), se ha descrito que la activación oncogénica de BRAF provoca cambios en la expresión de algunos TEM-TFs en favor de TWIST1 y ZEB1, que promueven desdiferenciación, y en detrimento de SNAIL2 y ZEB2, que se expresan en melanocitos normales (Caramel et al., 2013). Confirmamos, mediante RT-qPCR, que los melanomas primarios de animales con expresión de *Lox13* (WT) presentan mayores niveles de expresión de *Twist1* y *Zeb1* frente a los tumores de animales con delección de *Lox13* (KO) (Fig. 26), mientras que en ausencia de *Lox13* (KO) se observa una mayor expresión de *Zeb2*, *Snail2*, *E-cadherina* y *Mitf*, aunque estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas. Estos datos sugieren que la ausencia de *Lox13* en melanomas estaría favoreciendo un fenotipo más diferenciado y menos agresivo e invasivo que el que presentan los melanomas de ratones control con expresión de *Lox13*.

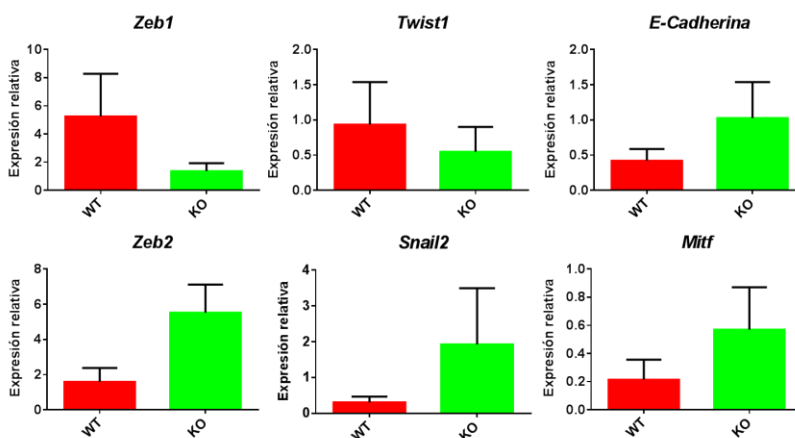


Figura 26. Análisis de la expresión de marcadores de plasticidad celular en melanomas primarios en función de la expresión de *Lox13*. Análisis de la expresión mediante RT-qPCR de TEM-TFs implicados en la plasticidad celular en melanoma (*Zeb1*, *Twist1*, *E-cadherina*, *Zeb2*, *Snail2* y *Mitf*) en lesiones de melanomas primarios generadas en ratones con expresión de *Lox13* (WT, n=5) o con delección de *Lox13* (KO, n=5) en melanocitos. Las diferencias no resultaron significativas en ningún caso, $p > 0,05$.

Finalmente, analizamos la expresión de marcadores de plasticidad en ganglios subilíacos, en este caso a nivel de proteína, detectándose mayor expresión de Zeb1 y Twist1 en los ganglios proximales de animales con expresión de *Lox/3* (WT) frente a los ganglios de animales que no expresan *Lox/3* (KO) en melanocitos (Fig. 27).

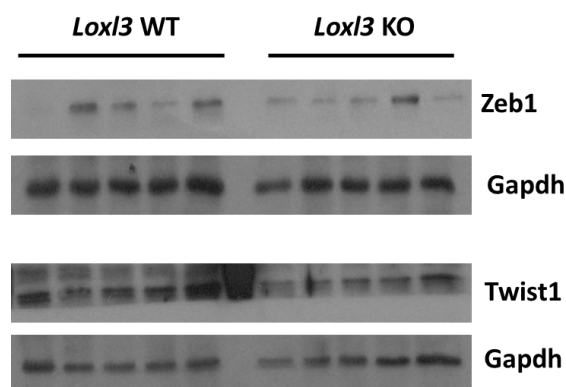


Figura 27. Análisis de la expresión proteica de marcadores relacionados con plasticidad celular en melanoma en ganglios linfáticos subilíacos. Análisis mediante *western blot* de los TEM-TFs Zeb1 y Twist1 implicados en plasticidad celular en extractos totales de los ganglios linfáticos subilíacos de ratones *Lox/3* WT (n=5) y ratones *Lox/3* KO (n=5). La detección de GAPDH se utilizó como control de carga.

Estos resultados preliminares sugieren que la mayor capacidad de diseminación metastática de las células de melanoma que expresan *Lox/3* puede estar relacionada con un mayor grado de plasticidad celular, pendiente de confirmar ampliando el número de muestras tumorales.



DISCUSIÓN

Discusión

1. Implicación de LOXL3 y LOXL2 en el desarrollo embrionario

1.1. La expresión de *Loxl2* o de *Loxl3* es necesaria para el desarrollo embrionario a partir del estadio E9,5

Los modelos genéticos de delección simple de *Loxl2* (*Loxl2*^{-/-}, L2-KO) y de *Loxl3* (*Loxl3*^{LacZ/LacZ}, L3-KO) (Tabla 1) generados en el laboratorio no muestran letalidad embrionaria asociada a la delección individual de cada gen (Martin et al., 2015, Floristán, 2015). Sin embargo, al cruzar animales heterocigotos para ambos genes (*Loxl2*^{+/-} X *Loxl3*^{+/-LacZ}) no se detectaron animales dobles KO (L2-KO/L3-KO) tras el destete (Floristán, 2015). Para evaluar la importancia de la presencia de ambas lisil oxidasas durante el desarrollo embrionario, se decidió analizar el efecto de la ausencia conjunta de *Loxl2* y *Loxl3* en distintas etapas embrionarias. Aunque se obtuvieron embriones que portan la doble delección de los genes *Loxl2* y *Loxl3* en el estadio E9,5, no se detectó ningún embrión doble KO en estadio E13,5 (Tabla 12 y Tabla 13). Tratando de acotar la viabilidad a lo largo del desarrollo de los embriones doble KO (L2-KO/L3-KO), se obtuvieron embriones en un estadio intermedio entre E9,5 y E13,5. En E11,5 tampoco se detectaron embriones con el genotipo correspondiente al doble KO, lo que indicaría que los embriones doble KO no son capaces de desarrollarse a partir del estadio embrionario E9,5, aunque es necesario incrementar el número de embriones analizados en E11,5 para obtener conclusiones firmes sobre este punto (Tabla 14).

Mientras que la expresión de *Loxl2* y *Loxl3* no se precisa hasta E9,5, a partir de ese estadio, la expresión de al menos uno de los dos genes es necesaria para la viabilidad del embrión. Esto indica que existe cierta redundancia en las funciones desempeñadas por *Loxl2* y *Loxl3* durante el desarrollo a partir del estadio E9,5 o, dicho de otro modo, la presencia de una de ellas es capaz de compensar la ausencia de la otra, puesto que los animales que carecen únicamente de *Loxl2* o de *Loxl3* presentan fenotipos distintos y característicos (Tabla 1).

En cuanto a la función concreta de *Loxl2* y *Loxl3* durante el desarrollo embrionario, se ha descrito en nuestro laboratorio la implicación de *Loxl2* en la formación del corazón, en concreto, en la formación de los septos ventriculares, por lo que la delección constitutiva de *Loxl2* en ratones provoca una letalidad perinatal de penetrancia incompleta (Martin et al., 2015). También, la delección de *Loxl2* en pez cebra provoca ausencia de circulación entre los vasos intersegmentarios del embrión, indicando la implicación de *Loxl2* en la formación correcta del sistema vascular (Bignon et al., 2011). En cuanto a *Loxl3*, los animales con delección constitutiva, modelo generado en nuestro grupo, presentan letalidad perinatal con penetrancia incompleta (próxima al 80%); además, los ratones adultos son de menor tamaño que los ratones control y presentan alteraciones locomotrices relacionadas con un desarrollo defectuoso del sistema músculo-esquelético y menor esperanza de vida (Floristán, 2015). Los modelos *Loxl3* KO constitutivos generados por otros autores también han mostrado que *Loxl3* es necesaria para la correcta formación del paladar y el desarrollo de la columna vertebral (Zhang et al., 2015), el desarrollo embrionario del pulmón (Zhang et al., 2016), así como para el correcto posicionamiento y anclaje de las miofibras a lo largo de la unión miotendinosa (Kraft-Sheleg et al., 2016).

Es interesante resaltar que es precisamente entre los estadios embrionarios E9,5 y E13,5 cuando tiene lugar el desarrollo de los sistemas cardiovascular, pulmonar y músculo-esquelético en los que *Loxl2* y *Loxl3* han sido implicadas en base a los fenotipos observados en los animales KO constitutivos de cada gen (Bignon et al., 2011, Martin et al., 2015, Floristán, 2015, Zhang et al., 2015, Zhang et al., 2016, Kraft-Sheleg et al., 2016). Así, en el estadio E10,5 se produce el desarrollo del sistema musculo-esquelético (Nichol et al., 2012), del sistema respiratorio con la ramificación bronquial (Kadzic et al., 2014) y del sistema cardiovascular con los primeros signos de la formación del tabique auricular (Jensen et al., 2017). Además, en el estadio E11 tiene lugar, principalmente a partir de la cresta neural, el comienzo del desarrollo del paladar (Potter and Potter, 2015), en cuya fusión y desarrollo secundario el proceso de TEM tiene una función predominante (Thiery et al., 2009, Nakajima et al., 2018). Puesto que *Loxl2* y *Loxl3* están implicadas en la estabilización de *Snail1* y en la inducción de la TEM (Peinado et al., 2005), se podría especular que la ausencia

de ambas lisil oxidasas impide procesos de TEM necesarios para el desarrollo embrionario más allá del estadio E9,5, como el necesario para el cierre del paladar.

Las funciones de *Loxl2* y *Loxl3* en la maduración de la MEC, fundamentales para el desarrollo embrionario de distintos órganos como el corazón, pulmón y sistema músculo-esquelético, junto con su posible implicación en procesos de TEM asociada al desarrollo, serían las responsables de que la ausencia de ambas proteínas provoque letalidad embrionaria a partir del estadio E9,5. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales que demuestren la posible implicación de *Loxl2* y *Loxl3* en procesos de TEM durante el desarrollo embrionario, ya que los datos que sustentan la vinculación de *Loxl2/Loxl3* con la TEM están restringidos hasta la fecha a procesos tumorales.

1.2. La sobreexpresión de *Loxl2* rescata la letalidad embrionaria asociada a la delección de *Loxl3*

Los fenotipos distintivos asociados a la delección constitutiva de cada uno de los genes *Loxl2* o *Loxl3* (Tabla 1) indican que estas lisil oxidasas presentan funciones específicas. No obstante, dada su elevada homología dentro de la familia LOX y el hecho de que hemos determinado una redundancia funcional en el desarrollo embrionario a partir del estadio E9,5, nos planteamos analizar si la sobreexpresión de *Loxl2* podía revertir el fenotipo de letalidad perinatal asociado a la ausencia de *Loxl3*.

Tras cruzar animales dobles heterocigotos para la sobreexpresión de *Loxl2* (*locus R26*) y la delección de *Loxl3* ($R26^{+/L2}; Loxl3^{+/LacZ}$ X $R26^{+/L2}; Loxl3^{+/LacZ}$) (Fig. 10) no se obtuvo descendencia, analizada tras el destete, que presentara la delección de *Loxl3* con niveles normales de *Loxl2*, es decir, sin sobreexpresión ($R26^{+/+}; Loxl3^{LacZ/LacZ}$) (Tabla 15). Según datos previos del laboratorio, que reflejan una letalidad perinatal del 80% asociada a la delección de *Loxl3* (Floristán, 2015), deberían haberse obtenido al menos 2 animales con el genotipo $R26^{+/+}; Loxl3^{LacZ/LacZ}$ entre los animales analizados. Esta diferencia podría explicarse por el diferente fondo genético de los animales resultantes del cruce entre animales heterocigotos $R26^{+/L2}$ y animales $Loxl3^{+/LacZ}$, respecto al fondo genético de los animales con

únicamente la delección de *Lox/3* (Floristán, 2015). Por otra parte, el número de animales analizados podría considerarse insuficiente, dada la letalidad perinatal provocada por la ausencia de *Lox/3*, por lo que sería necesario aumentar el número total de animales analizados para confirmar los resultados actuales.

No obstante, al sobreexpresar *Lox/2* a partir de uno o de los dos alelos del *locus* *R26*, se revierte la letalidad perinatal de los animales *Lox/3* KO, obteniéndose animales que portan la delección de *Lox/3* en homocigosis ($R26^{+/L2}; Lox/3^{LacZ/LacZ}$ y $R26^{L2/L2}; Lox/3^{LacZ/LacZ}$). Destacar que en el caso de la sobreexpresión de *Lox/2* en heterocigosis ($R26^{+/L2}; Lox/3^{LacZ/LacZ}$) se da, aparentemente, mayor eficiencia de rescate que cuando se sobreexpresa *Lox/2* en homocigosis ($R26^{L2/L2}; Lox/3^{LacZ/LacZ}$) (ver Tabla 15). No obstante, las diferencias entre la frecuencia de animales esperados y obtenidos con el genotipo $R26^{+/L2}; Lox/3^{LacZ/LacZ}$, así como de otros genotipos (por ej., dobles heterocigotos para los dos alelos: $R26^{+/L2}; Lox/3^{+/LacZ}$) se deben a la compensación de frecuencias que tiene lugar cuando existe letalidad asociada a un genotipo.

Por otra parte, desconocemos si el rescate mediado por la sobreexpresión de *Lox/2* de la letalidad perinatal asociada a la delección de *Lox/3* conlleva asimismo un rescate de los distintos fenotipos provocados por la ausencia de *Lox/3* en animales adultos (Floristán, 2015), aspecto que requiere estudios adicionales.

2. *Lox/3* contribuye a la capacidad clonogénica y metastática de la línea de melanoma murino B16F10

Para caracterizar la función de *Lox/3* en líneas celulares de melanoma murino, se utilizó la línea B16F10 en la que, tras el silenciamiento de *Lox/3*, se observó una reducción significativa en la proliferación celular en cultivos 2D entre las células B16F10 silenciadas para la expresión de *Lox/3* y las células control (Fig. 13). Sin embargo, no se detectaron alteraciones en el ciclo celular ni diferencias en apoptosis entre las dos situaciones experimentales que pudieran explicar la menor proliferación tras el silenciamiento de *Lox/3*. Tampoco se observaron diferencias en la capacidad tumorigénica *in vivo* entre células B16F10 control y células que no expresan *Lox/3* (Fig. 15). No obstante, sí se encontraron

diferencias significativas tras el silenciamiento de *Loxl3* en la capacidad clonogénica y de transformación de las células B16F10 (Fig. 14), lo que sugiere la implicación de *Loxl3* en la transformación maligna de las células de melanoma murino, acorde con lo observado previamente en células de melanoma humano (Santamaría et al., 2018). De hecho, la capacidad metastática *in vivo* de las células B16F10 se ve seriamente reducida tras el silenciamiento de *Loxl3* (Fig. 16).

El hecho de que el silenciamiento de *Loxl3* no tenga efectos sobre la apoptosis ni el ciclo celular en las células B16F10 contrasta con los resultados previos obtenidos por nuestro grupo en células de melanoma humano, en las que tras el silenciamiento de *LOXL3*, las células dejan de proliferar, presentan alteraciones en la correcta progresión del ciclo celular y acumulan aberraciones genómicas que finalmente conllevan la activación de apoptosis y muerte celular. El silenciamiento de *LOXL3* en células de melanoma humano provoca asimismo una reducción de su capacidad tumorigénica *in vivo* (Santamaría et al., 2018). Las diferencias obtenidas en estos dos modelos de melanoma podrían explicarse por la alta capacidad proliferativa y metastática de las células B16F10 murinas (Fidler, 1973) y/o por la acumulación de numerosas alteraciones genéticas debida a su dilatada expansión en cultivo que pudiera enmascarar el efecto del silenciamiento de *Loxl3*. *LOXL3* es necesaria para la supervivencia de células de melanoma humano porque contribuye a mantener la estabilidad genómica. Así, tras la depleción de *LOXL3*, las células de melanoma humano muestran una respuesta al daño en el DNA defectuosa lo que provoca la acumulación de roturas de doble cadena, la aparición de mitosis aberrantes y alteraciones genómicas (Santamaría et al., 2018). Es posible que las células de melanoma humano sean más sensibles que las de ratón (al menos la línea celular B16F10) en su capacidad de respuesta al daño en el DNA, y por ello, el efecto observado tras el silenciamiento de *LOXL3* sea mayor. Son necesarios estudios adicionales en otras líneas de melanoma murino para confirmar los resultados obtenidos. En este sentido, estudios preliminares realizados en las líneas de melanoma murino Yumm1.1 y Yumm1.7 (Meeth et al., 2016), no proporcionaron resultados concluyentes (datos no presentados). Estudios en desarrollo en el laboratorio con líneas de

melanomas primarios generadas en el grupo (A. Vázquez-Naharro, datos no publicados) permitirán avanzar en estos aspectos en el futuro.

En resumen, los resultados obtenidos en las células B16F10 sustentan la implicación de *Loxl3* en la proliferación, clonogenicidad y transformación *in vitro* de células de melanoma murino así como en la metástasis experimental de estas células, de forma similar a lo descrito para otros integrantes de la familia como LOX, LOXL1 y LOXL2 en otros modelos tumorales, como carcinoma de mama, entre otros (Akiri et al., 2003, Erler et al., 2006, Erler et al., 2009, Barker et al., 2011, Baker et al., 2011, Moreno-Bueno et al., 2011, Cox et al., 2015, Trackman, 2016b, Salvador et al., 2017, Kasashima et al., 2018).

3. Implicación de *Loxl3* en melanoma

3.1. *Loxl3* participa en la melanomagénesis, supervivencia y metástasis linfática

El modelo condicional e inducible de melanoma murino descrito por Dankort y colaboradores (*Tyr::CreERT²; Bra^f^{V600E/+}; Pten^{loxP/loxP}*) basado en la activación de *Braf* (*Bra^f^{V600E}*) y la delección simultánea de *Pten* (*Pten^{flox/flox}*) mediadas por la recombinasa CreERT² expresada bajo el promotor *Tyr*, específico de melanocitos, es uno de los modelos de melanoma cutáneo que mejor reproduce la generación y progresión del melanoma humano (Dankort et al., 2009). Además, presenta la ventaja de que las lesiones melanocíticas tras el tratamiento tópico con 4-HT tienen baja latencia (5 semanas) y una penetrancia del 100%, a diferencia de otros modelos de melanoma descritos en la literatura (ver Tabla 4 y Tabla 5). Asimismo, los melanomas que se generan recapitulan la mayoría de las características de este tumor en humanos, como es la progresión de lesiones pigmentadas a melanomas metastáticos capaces de diseminarse a ganglios linfáticos y órganos vitales (Dankort et al., 2009). Con el fin de estudiar la implicación de *Loxl3* en la melanomagénesis, se cruzaron animales del modelo *Tyr::CreERT²; Bra^f^{V600E/+}; Pten^{loxP/loxP}* con los del modelo de delección condicional de *Loxl3* (*Loxl3^{loxP/loxP}*), generado previamente en nuestro laboratorio (Fig. 4). Tras los cruces adecuados, se obtuvo una nueva línea de ratón que denominamos *Loxl3* KO: *Tyr::CreERT²; Bra^f^{V600E/+}; Pten^{loxP/loxP}; Loxl3^{loxP/loxP}*; en la que, tras la aplicación de 4-HT, se delecionan simultáneamente *Loxl3* y *Pten* y se expresa el alelo

Braf^{V600E} que codifica la proteína Braf constitutivamente activa (Fig. 5), dándose estos cambios únicamente en melanocitos. En paralelo, se obtuvo una nueva línea de ratón que denominamos *Lox/3* WT: *Tyr::CreER*^{T2}; *Braf*^{V600E/+}; *Pten*^{loxP/loxP}; *Lox/3*^{+/+}, idéntica a la anterior excepto que el gen *Lox/3* no presenta las secuencias loxP y, por ello, no se deletiona tras la aplicación de 4-HT, dando lugar a la línea control utilizada a lo largo del estudio (Fig. 6).

En primer lugar, provocamos la activación localizada de la recombinasa Cre (y las consecuentes recombinaciones de los transgenes) en ratones control *Lox/3* WT y *Lox/3* KO mediante el tratamiento tópico con 4-HT sobre el lomo de los animales de 1 mes de edad y previamente rasurados para poder observar en detalle la progresión y características de las lesiones melanocíticas. Este tratamiento es menos agresivo que otros descritos en el modelo parental en los que se inyecta intraperitonealmente 4-HT para activar la recombinasa Cre en todos los melanocitos del organismo o se administra 4-HT perinatalmente (Dankort et al., 2009). El tratamiento tópico generó lesiones iniciales pigmentadas o *nevi*, que evolucionaron a melanomas primarios (Fig. 18) en ambos grupos de ratones. La eficiencia de la generación de las recombinaciones génicas esperadas tras el tratamiento con 4-HT se confirmó en lesiones tumorales en comparación con zonas no tratadas como la cola de ratón (Fig. 17), validando por tanto el modelo genético. El estudio de las lesiones en ambos grupos de ratones puso de manifiesto que, en ausencia de *Lox/3*, la latencia de aparición de las lesiones iniciales era mayor y su progresión a melanoma era más lenta en comparación con el comportamiento de ambos parámetros en los ratones control (Fig. 19). Estos resultados contrastan con los obtenidos previamente, utilizando las células de melanoma murino B16F10, ya que no observamos diferencias en el crecimiento tumoral primario tras inyectarlas ortotópicamente en ratones singénicos independientemente de la expresión de *Lox/3* (Fig. 15). Además de las diferencias obvias entre ambos modelos experimentales, según los datos del atlas del genoma del cáncer (TCGA) (Cancer Genome Atlas, 2015), los niveles de mRNA de *LOXL3* son significativamente más elevados en muestras de pacientes con melanomas que presentan mutaciones oncogénicas en *BRAF* (como el modelo murino que hemos generado) o en genes de la ruta MAPK (*NRAS* y *NF1*), que en melanomas sin mutaciones en ninguno de ellos (denominados

triple WT) (Santamaría et al., 2018). En relación con esta observación, la línea celular de melanoma murino B16F10 no tiene mutaciones en *Braf*, sino que presenta una delección en el locus *Cdkn2a* y, en consecuencia, ha perdido la expresión de las proteínas supresoras de tumores p16^{Ink4a} y p19^{Arf} (Melnikova et al., 2004). Esta particularidad podría contribuir a explicar las diferencias observadas respecto al crecimiento tumoral con las líneas de melanoma humano tras la eliminación de *LOXL3* así como con el modelo genético de melanoma generado.

Por otra parte, es relevante destacar que los ratones con delección de *Loxl3* en las lesiones melanocíticas mostraron una mayor supervivencia global respecto a los ratones con expresión de *Loxl3* (Fig. 20), con una supervivencia media similar a la descrita en el modelo *Braf*/*Pten* (Dankort et al., 2009). Estos resultados apoyan, la participación de *Loxl3* en la progresión y malignidad de los melanomas cutáneos murinos.

Puesto que observamos diferencias macroscópicas en los ganglios linfáticos (pigmentación por melanina y tamaño) entre animales *Loxl3* WT y *Loxl3* KO tras su tratamiento con 4-HT, se analizó en mayor detalle la diseminación por parte de células de origen melanocítico en los ganglios subilíacos (proximales) y en los ganglios superficiales parotídeos (distales) en ambos tipos de animales en un experimento diseñado específicamente para este estudio.

En primer lugar, el análisis de la expresión de marcadores de linaje confirmó el origen melanocítico de las lesiones linfáticas detectadas. Además, los ganglios de animales de *Loxl3* WT presentaban mayor expresión de marcadores de linaje melanocítico, a nivel de mRNA y proteína, frente a los de animales *Loxl3* KO (Fig. 24). Estos resultados confirmaron que la presencia de *Loxl3* confiere mayor capacidad de diseminación a las células del melanoma, al considerarse estos niveles de expresión una medida indirecta del grado de diseminación de las células que provienen del tumor primario. En consonancia con estos datos, se observó una reducción significativa de la capacidad de diseminación a ganglios regionales y distales a partir de tumores primarios de animales *Loxl3* KO frente a los de animales control (Fig. 21 y Fig. 23).

La aparición de células de melanoma en ganglios linfáticos, calificada como metástasis primaria, se utiliza en clínica como un indicador de diseminación metastática, aunque las metástasis que involucran localizaciones viscerales aparecen posteriormente durante la progresión del melanoma (Shain and Bastian, 2016). Asimismo, en la práctica clínica se realiza rutinariamente una biopsia del ganglio o ganglios donde drena el tumor primario cuyo análisis histopatológico tiene valor pronóstico (Bartlett, 2019). Con el objeto de mejorar el tratamiento clínico de los pacientes con melanoma es relevante determinar los mecanismos moleculares involucrados en la colonización de ganglios proximales y distales. Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran la implicación de Loxl3 en metástasis, al favorecer la diseminación linfática del melanoma murino. Estos datos, junto con nuestros resultados previos en melanoma humano, apoyan la relevancia clínica de LOXL3 en esta patología. El estudio de los mecanismos moleculares regulados por LOXL3 así como la búsqueda de vías para inactivar algunas de sus funciones, puede sentar las bases para el diseño de futuras terapias anti-melanoma.

3.2. Contribución de Loxl3 a la metástasis en órganos vitales

La capacidad de metástasis a ganglios linfáticos y pulmones (Tabla 5), descrita inicialmente en el modelo genético de melanoma creado por Dankort y colaboradores, fue determinante para su elección como modelo de estudio de la contribución de Loxl3 a la progresión del melanoma. De hecho, nuestro objetivo inicial era evaluar la implicación de Loxl3 en la metástasis distal visceral, además de en la melanomagénesis y metástasis linfática.

Dankort y colaboradores describieron la presencia de metástasis pigmentadas en pulmón tras tratar simultáneamente con 4-HT (25-50 mg/mL) a ratones en oreja, flanco y cola tras su nacimiento (Dankort et al., 2009). Posteriormente, en un modelo genético murino derivado de éste que incorpora o no la delección de Sox2 (*Tyr::CreERT²*; *Braf^{V600E/+}*; *Pten^{loxP/loxP}*; *Sox2^{loxP/loxP}*), se describieron metástasis pulmonares no pigmentadas (Cesarini et al., 2017, Vitiello et al., 2019). Por otro lado, algunos autores han descrito en un modelo

análogo al de esta tesis (*Tyr::CreER^{T2}; Braf^{ΔSL-V600E/+}; Pten^{loxP/loxP}*) la presencia de metástasis pigmentadas en pulmón (Laurette et al., 2019). En ambos casos el tratamiento descrito es local en el lomo de los animales con igual concentración de 4-HT (2 mg/mL) que la utilizada durante el desarrollo de la presente tesis.

En ratones *Lox/3* WT y KO de nuestro modelo (*Tyr::CreER^{T2}; Braf^{V600E/+}; Pten^{loxP/loxP}* con *Lox/3^{+/+}* o *Lox/3^{loxP/loxP}* respectivamente) se observaron lesiones en pulmón tras la generación de lesiones primarias que, a diferencia de las metástasis observadas en ganglios linfáticos, no presentaban pigmentación (Fig. 25). La ausencia de pigmentación en las lesiones pulmonares puede deberse a la pérdida de la capacidad de sintetizar melanina, intrínseca a los melanocitos, debido a procesos de desdiferenciación frecuentes durante la progresión metastática de los tumores de melanoma (Laurette et al., 2019). De hecho, otros autores han descrito, en un modelo de melanoma en pez cebra, que durante la iniciación del melanoma tiene lugar una desdiferenciación de los melanocitos a precursores de la cresta neural (Kaufman et al., 2016). Por otro lado, las denominadas células troncales melanocíticas no muestran pigmentación (Moon et al., 2017), lo que en conjunto podría explicar que las lesiones observadas en los pulmones se correspondieran con metástasis de los melanomas primarios generados.

Sin embargo, tras realizar tinciones inmunohistoquímicas frente a Sox10, marcador de linaje melanocítico (Willis et al., 2015), en las lesiones pulmonares detectadas en animales *Lox/3* WT y *Lox/3* KO, éstas resultaron negativas (Fig. 25). Por el contrario, tanto los tumores primarios como las metástasis detectadas en ganglios linfáticos en ambos grupos experimentales eran positivas para Sox10 y otros marcadores de linaje melanocítico (Figs. 22, 23, 25 B y datos no mostrados). Además, las tinciones de hematoxilina-eosina de las lesiones pulmonares revelaban una histología compatible con adenomas pulmonares (Fig. 25 B). Asimismo, el análisis de su incidencia no arrojó diferencias estadísticamente significativas en función de la presencia o ausencia de *Lox/3* en melanomas primarios (Fig. 25 A). Todo ello nos llevó a concluir que estas lesiones pulmonares no son de origen melanocítico, y por tanto, en contra de lo que sugieren otros autores (Cesarini et al., 2017, Vitiello et al., 2019), no provienen del tumor primario. Nuestros resultados concuerdan con

los obtenidos por otros autores en un modelo análogo de activación de *Braf* y delección de *Pten* pero en un fondo genético puro, donde realizan el mismo protocolo de tratamiento que el de nuestros estudios, y detectan metástasis en los ganglios linfáticos a los que drena el tumor pero no observan metástasis viscerales (Hooijkaas et al., 2012). De hecho, la presencia de metástasis pigmentadas en pulmón, descrita por Dankort y colaboradores en el modelo *Braf/Pten* es plausible que sea consecuencia del uso de una mayor concentración de 4-HT, así como del tratamiento simultáneo perinatal en oreja, cola y lomo de los ratones o por el diferente fondo genético en el caso de Laurette y colaboradores. En nuestro caso, es probable que la ausencia de metástasis pulmonares macroscópicas se deba a que sacrificamos a los animales tras su tratamiento, por cuestiones éticas, en un periodo de tiempo insuficiente para el desarrollo de las mismas. No podemos descartar que *Loxl3* esté implicada en la colonización metastática de órganos vitales y, de hecho, los datos de su participación en la diseminación linfática sugieren que sí lo puede estar, reforzando los resultados obtenidos en los experimentos de metástasis experimental con las células B16F10.

3.3. *Loxl3* y su relación con la plasticidad y diferenciación celular

Estudios previos han mostrado la existencia de un alto grado de plasticidad celular en melanoma, asociado a cambios en el patrón de expresión de determinados TEM-FTs (Caramel et al., 2013, Denecker et al., 2014). Así, en melanoma humano se ha descrito que la activación oncogénica de BRAF y su cascada de señalización provoca cambios en la expresión de los TEM-FTs en favor de TWIST1 y ZEB1. Estos factores de transcripción promueven desdiferenciación y favorecen la transformación neoplásica, a diferencia de lo que ocurre en melanocitos normales en los que la expresión de SNAIL2 y ZEB2 contribuye a mantener el programa de diferenciación melanocítica dependiente de MITF (Caramel et al., 2013). De igual forma, se ha descrito una función esencial del eje ZEB2-MITF-ZEB1 en la melanomagénesis y progresión maligna en melanoma murino y humano (Denecker et al., 2014).

Para tratar de explicar la mayor capacidad de diseminación a ganglios linfáticos de los tumores de ratones *Lox/3* WT frente a los ratones *Lox/3* KO, se analizó, mediante RT-qPCR, la expresión de distintos marcadores de plasticidad celular en tumores primarios. Este análisis mostró que en los tumores de ratones *Lox/3* KO hay menor expresión de *Zeb1* y *Twist1* y mayores niveles de *Zeb2*, *Snail2*, *E-cadherina* y *Mitf* que en los tumores de ratones *Lox/3* WT (Fig. 26). Estos resultados sugieren que, en presencia de *Lox/3*, las lesiones melanocíticas presentan un fenotipo asociado a mayor plasticidad (expresión de *Zeb1* y *Twist1*) lo que podría contribuir a su mayor capacidad de diseminación metastática. En el caso de los melanomas primarios que se generan en ausencia de *Lox/3*, estos presentarían mayor grado de diferenciación (expresión de *Zeb2*, *Snail2*, *E-cadherina* y *Mitf*) limitando su capacidad de metástasis. De hecho, el estudio de estos marcadores a nivel de proteína en los ganglios linfáticos subilíacos de ratones con lesiones primarias, reveló mayores niveles de *Zeb1* y *Twist1* en los animales *Lox/3* WT frente a los de animales *Lox/3* KO (Fig. 27), sustentando la hipótesis de que los melanomas que expresan *Lox/3* presentan mayor potencial para metastatizar que los melanomas que no expresan *Lox/3* y, por este motivo, se detectan células de melanoma diseminadas en ganglios en mayor proporción en los ratones control.

Es posible que, de forma análoga a lo descrito para la progresión del melanoma uveal (Chen et al., 2017), *Zeb1* esté regulando la progresión tumoral favoreciendo la proliferación, desdiferenciación, invasión y diseminación. En los melanomas que no expresan *Lox/3*, disminuye la expresión de *Zeb1* en favor de la expresión de *Mitf*, *Cdh1* y *Snail2*, lo que induciría un cambio del fenotipo mesenquimático asociado a desdiferenciación e invasividad en melanoma (Santamaria et al., 2019), hacia un fenotipo más diferenciado. Para confirmar estos resultados es necesario realizar un análisis exhaustivo mediante inmunohistoquímica de la expresión de estos marcadores en una amplia muestra de melanomas primarios así como en los ganglios afectados.

Aún no se ha dilucidado si el melanoma cutáneo se inicia a partir de melanocitos maduros o precursores de células troncales (Soengas and Patton, 2017). El análisis funcional de células melanocíticas en sus nichos fisiológicos, mediante la adquisición de imágenes *in*

vivo en pez cebra, determinó la aparición de melanomas a partir de su desdiferenciación hacia un precursor temprano de la cresta neural, una característica condicionada por factores microambientales (Kaufman et al., 2016). En ratones modificados genéticamente, que portan promotores de genes específicos de melanocitos (Tyr o Tyrp2) regulando la expresión de oncogenes modificados para recapitular las alteraciones genéticas características del melanoma, se ha observado un cambio fenotípico que involucra la pérdida de los marcadores de linaje (Perez-Guijarro et al., 2017). Se ha demostrado que la desdiferenciación en células de melanoma humanas implica un cambio de expresión en los TEM-FTs a favor de TWIST1 y ZEB1 (Caramel et al., 2013). A su vez, en un modelo genético murino con delección de *Zeb2* en el linaje melanocítico, la desdiferenciación provoca una disminución de la expresión de *Mitf* y un aumento de *Zeb1* (Denecker et al., 2014). Sin embargo, la naturaleza precisa de las células de origen del melanoma sigue sin estar clara. Mediante estudios *in vivo* de rastreo de linaje en modelos murinos, se ha descrito la iniciación del melanoma a partir de la activación de células troncales de los melanocitos en respuesta a la exposición a radiación ultravioleta (Moon et al., 2017), mientras que otros estudios apoyan la melanomagénesis a partir de la expansión y desdiferenciación de melanocitos pigmentados maduros (Kohler et al., 2017). Los resultados obtenidos en el presente estudio respaldarían el origen del melanoma a partir de la desdiferenciación de melanocitos adultos puesto que, al eliminar *Loxl3*, aumenta la expresión de *Mitf* (Fig. 26), regulador crucial del linaje melanocítico que estaría favoreciendo mayor diferenciación de las lesiones. En este contexto, es interesante destacar que los resultados obtenidos estarían también de acuerdo con la implicación de LOXL3 y LOXL2 en la inducción de procesos de TEM (Peinado et al., 2005, Cuevas et al., 2014), así como con la acción de LOXL2 en progresión tumoral al promover un fenotipo menos diferenciado y más invasivo y metastático en otros tipos tumorales, como carcinomas escamosos y carcinomas de mama (Peinado et al., 2008, Moreno-Bueno et al., 2011, Martin et al., 2015, Salvador et al., 2017). La implicación de procesos de TEM en la inducción de propiedades de células troncales en otros tumores (Mani et al., 2008, Morel et al., 2008, Dongre and Weinberg, 2019), así como su asociación con la resistencia a tratamientos antitumorales (Santamaria et al., 2019),

ofrecen nuevas perspectivas en relación con la posible contribución de LOXL3 a estos procesos en melanoma, aspectos de gran relevancia clínica pendientes de estudios específicos.

3.4. Loxl3 constituye una nueva diana terapéutica en melanoma

Los resultados obtenidos en la presente tesis a partir de la caracterización del modelo murino de melanoma Braf/Pten con o sin Loxl3, respaldan la implicación de Loxl3 tanto en la progresión del melanoma como en su diseminación metastática (Fig. 28).

En primer lugar, la delección de Loxl3 en melanocitos provoca un retraso en la aparición de las lesiones iniciales así como en su progresión maligna (Fig. 19), confirmando la participación de Loxl3 en la melanomagénesis y progresión del melanoma. En segundo lugar, la ausencia de Loxl3 favorece una reducción significativa en la diseminación metastática a ganglios linfáticos, que se manifiesta especialmente en los ganglios distales (Fig. 21). Como consecuencia, la ausencia de Loxl3 se traduce en un aumento significativo de la supervivencia global (Fig. 20).

La participación de Loxl3 en la progresión y diseminación del melanoma consolidan la validez de Loxl3 como diana terapéutica en melanoma. Además, los modelos animales generados durante el desarrollo de esta tesis constituyen modelos preclínicos útiles para determinar la eficacia de nuevos abordajes terapéuticos dirigidos a inactivar las funciones de Loxl3 tanto en la iniciación como en la progresión metastática del melanoma (Fig. 28). En este sentido, es relevante destacar el interés reciente de la industria farmacéutica en el desarrollo de nuevos inhibidores de pequeño tamaño frente a LOXL2, alguno de los cuales también presentan actividad frente a LOXL3 (Hutchinson et al., 2017, Rowbottom et al., 2017, Hajdu et al., 2018, Schilter et al., 2019). En consecuencia, será particularmente relevante analizar la eficacia de éstos u otros inhibidores frente a la progresión del melanoma en los modelos preclínicos generados en el presente estudio.

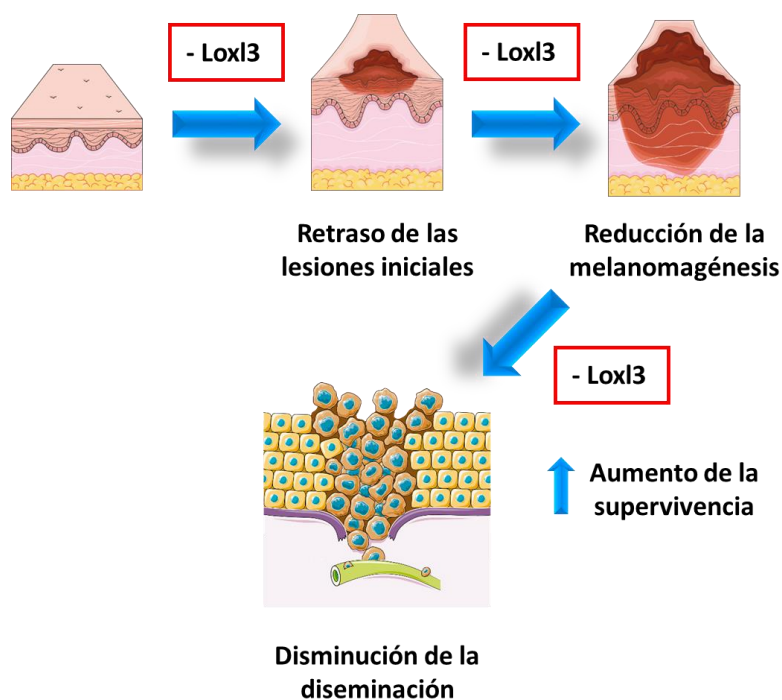


Figura 28. Efectos de la delección de *Loxl3* en el modelo genético murino de melanoma. Esquema representativo de la iniciación y progresión de los melanomas en los ratones *Braf/Pten* destacando los resultados obtenidos en este estudio como consecuencia de la eliminación de *Loxl3*.



CONCLUSIONES

Conclusiones

- 1) La expresión de al menos uno de los dos genes, *Lox/2* y *Lox/3*, es necesaria para culminar el desarrollo embrionario murino. La expresión de *Lox/2* y *Lox/3* es prescindible durante el desarrollo embrionario hasta el estadio E9,5, punto a partir del cual la doble delección de *Lox/2* y *Lox/3* es incompatible con el desarrollo de los embriones.
- 2) La sobreexpresión de *Lox/2* rescata la letalidad perinatal asociada a la delección de *Lox/3*.
- 3) El silenciamiento de la expresión de *Lox/3* en la línea de melanoma murino B16F10 ralentiza la proliferación celular, disminuye su capacidad clonogénica y de transformación celular en ensayos *in vitro*.
- 4) *Lox/3* favorece la metástasis pulmonar en ensayos de metástasis experimental en ratones singénicos inyectados con la línea de melanoma murino B16F10.
- 5) La ausencia de *Lox/3* en melanocitos retrasa la aparición de las lesiones iniciales, su crecimiento y la progresión de los melanomas, favoreciendo un aumento de la supervivencia de los ratones con tumores del modelo genético *Braf/Pten/Lox/3* (*Tyr::CreER^{T2}; Braff^{CA/+}; Pten^{loxP/loxP}; Lox/3^{loxP/loxP}*) frente a la de los ratones control con tumores *Braf/Pten* (*Tyr::CreER^{T2}; Braff^{CA/+}; Pten^{loxP/loxP}; Lox/3^{+/+}*)
- 6) *Lox/3* tiene una función crítica en la progresión metastática del melanoma al conferir mayor capacidad de diseminación linfática, siendo su expresión esencial para que las células del tumor primario alcancen los ganglios linfáticos distales.



BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Ackermann, J., Fruttschi, M., Kaloulis, K., McKee, T., Trumpp, A. & Beermann, F. 2005. Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background. *Cancer Res*, 65, 4005-4011.
- ACS 2019. Cancer Facts & Figures 2019. Atlanta: American Cancer Society 2019.
- Ahn, S. G., Dong, S. M., Oshima, A., Kim, W. H., Lee, H. M., Lee, S. A., Kwon, S. H., Lee, J. H., Lee, J. M., Jeong, J., Lee, H. D. & Green, J. E. 2013. LOXL2 expression is associated with invasiveness and negatively influences survival in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 141, 89-99.
- Akiri, G., Sabo, E., Dafni, H., Vadasz, Z., Kartvelishvily, Y., Gan, N., Kessler, O., Cohen, T., Resnick, M., Neeman, M. & Neufeld, G. 2003. Lysyl oxidase-related protein-1 promotes tumor fibrosis and tumor progression in vivo. *Cancer Res*, 63, 1657-1666.
- Aljanabi, S. M. & Martinez, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res*, 25, 4692-4693.
- Alsofi, L., Daley, E., Hornstra, I., Morgan, E. F., Mason, Z. D., Acevedo, J. F., Word, R. A., Gerstenfeld, L. C. & Trackman, P. C. 2016. Sex-linked skeletal phenotype of lysyl oxidase like-1 mutant mice. *Calcif Tissue Int*, 98, 172-185.
- Alzahrani, F., Al Hazzaa, S. A., Tayeb, H. & Alkuraya, F. S. 2015. LOXL3, encoding lysyl oxidase-like 3, is mutated in a family with autosomal recessive Stickler syndrome. *Hum Genet*, 134, 451-453.
- Aumiller, V., Strobel, B., Romeike, M., Schuler, M., Stierstorfer, B. & Kreuz, S. 2017. Comparative analysis of lysyl oxidase (like) family members in pulmonary fibrosis. *Sci Rep*, 7:149, doi: 10.1038/s41598-017-00270-41590.
- Aung, T., Ozaki, M., Lee, M. C., Schlotzer-Schrehardt, U., Thorleifsson, G., Mizoguchi, T., Igo, R. P., Jr., Haripriya, A., Williams, S. E., Astakhov, Y. S., Orr, A. C., Burdon, K. P., Nakano, S., Mori, K., Abu-Amero, K., Hauser, M., Li, Z., Prakadeeswari, G., Bailey, J. N. C., Cherecheanu, A. P., Kang, J. H., Nelson, S., Hayashi, K., Manabe, S. I., Kazama, S., Zarnowski, T., Inoue, K., Irkec, M., Coca-Prados, M., Sugiyama, K., Jarvela, I., Schlottmann, P., Lerner, S. F., Lamari, H., Nilgun, Y., Bikbov, M., Park, K. H., Cha, S. C., Yamashiro, K., Zenteno, J. C., Jonas, J. B., Kumar, R. S., Perera, S. A., Chan, A. S. Y., Kobakhidze, N., George, R., Vijaya, L., Do, T., Edward, D. P., de Juan Marcos, L., Pakravan, M., Moghimi, S., Ideta, R., Bach-Holm, D., Kappelgaard, P., Wirostko, B., Thomas, S., Gaston, D., Bedard, K., Greer, W. L., Yang, Z., Chen, X., Huang, L., Sang, J., Jia, H., Jia, L., Qiao, C., Zhang, H., Liu, X., Zhao, B., Wang, Y. X., Xu, L., Leruez, S., Reynier, P., Chichua, G., Tabagari, S., Uebe, S., Zenkel, M., Berner, D., Mossbock, G., Weisschuh, N., Hoja, U., Welge-Luessen, U. C., Mardin, C., Founti, P., Chatzikiyriakidou, A., Pappas, T., Anastasopoulos, E., Lambropoulos, A., Ghosh, A., Shetty, R., Porporato, N., Saravanan, V., Venkatesh, R., Shivkumar, C., Kalpana, N., Sarangapani, S., Kanavi, M. R., Beni, A. N., Yazdani, S., Lashay, A., Naderifar, H., Khatibi, N., Fea, A., Lavia, C., Dallorto, L., Rolle, T., Frezzotti, P., Paoli, D., Salvi, E., Manunta, P., Mori, Y., Miyata, K., Higashide, T., Chihara, E., Ishiko, S., Yoshida, A., Yanagi, M., Kiuchi, Y., Ohashi, T., Sakurai, T., Sugimoto, T., Chuman, H., Aihara, M.,

- Inatani, M., Miyake, M., Gotoh, N., Matsuda, F., Yoshimura, N., Ikeda, Y., Ueno, M., Sotozono, C., Jeoung, J. W., Sagong, M., Park, K. H., Ahn, J., Cruz-Aguilar, M., Ezzouhairi, S. M., Rafei, A., Chong, Y. F., Ng, X. Y., Goh, S. R., Chen, Y., Yong, V. H. K., Khan, M. I., Olawoye, O. O., Ashaye, A. O., Ugbede, I., Onakoya, A., Kizor-Akaraiwe, N., Teekhasaene, C., Suwan, Y., Supakontanasan, W., Okeke, S., Uche, N. J., Asimadu, I., Ayub, H., Akhtar, F., Kosior-Jarecka, E., Lukasik, U., Lischinsky, I., Castro, V., Grossmann, R. P., Sunaric Megevand, G., Roy, S., Dervan, E., Silke, E., Rao, A., Sahay, P., Fornero, P., Cuello, O., Sivor, D., Zompa, T., Mills, R. A., Souzeau, E., Mitchell, P., Wang, J. J., Hewitt, A. W., Coote, M., Crowston, J. G., Astakhov, S. Y., Akopov, E. L., Emelyanov, A., Vysochinskaya, V., Kazakbaeva, G., Fayzrakhmanov, R., Al-Obeidan, S. A., Owaidhah, O., Aljasim, L. A., Chowbay, B., Foo, J. N., Soh, R. Q., Sim, K. S., Xie, Z., Cheong, A. W. O., Mok, S. Q., Soo, H. M., Chen, X. Y., Peh, S. Q., Heng, K. K., Husain, R., Ho, S. L., Hillmer, A. M., Cheng, C. Y., Escudero-Dominguez, F. A., Gonzalez-Sarmiento, R., Martinon-Torres, F., Salas, A., Pathanapitoon, K., Hansapinyo, L., Wanichwecharugruang, B., Kitnarong, N., Sakuntabhai, A., Nguyn, H. X., Nguyn, G. T. T., Nguyn, T. V., Zenz, W., Binder, A., Klobassa, D. S., Hibberd, M. L., Davila, S., Herms, S., Nothen, M. M., Moebus, S., Rautenbach, R. M., Ziskind, A., Carmichael, T. R., Ramsay, M., Alvarez, L., Garcia, M., Gonzalez-Iglesias, H., Rodriguez-Calvo, P. P., Fernandez-Vega Cueto, L., Oguz, C., Tamcelik, N., Atalay, E., Batu, B., Aktas, D., Kasim, B., Wilson, M. R., Coleman, A. L., Liu, Y., Challa, P., Herndon, L., Kuchtey, R. W., Kuchtey, J., Curtin, K., Chaya, C. J., Crandall, A., Zangwill, L. M., Wong, T. Y., Nakano, M., Kinoshita, S., den Hollander, A. I., Vesti, E., Fingert, J. H., Lee, R. K., Sit, A. J., Shingleton, B. J., Wang, N., Cusi, D., Qamar, R., Kraft, P., Pericak-Vance, M. A., Raychaudhuri, S., Heegaard, S., Kivela, T., Reis, A., Kruse, F. E., Weinreb, R. N., Pasquale, L. R., Haines, J. L., Thorsteinsdottir, U., Jonasson, F., Allingham, R. R., Milea, D., Ritch, R., Kubota, T., Tashiro, K., Vithana, E. N., Micheal, S., Topouzis, F., Craig, J. E., Dubina, M., Sundaresan, P., Stefansson, K., Wiggs, J. L., Pasutto, F. & Khor, C. C. 2017. Genetic association study of exfoliation syndrome identifies a protective rare variant at LOXL1 and five new susceptibility loci. *Nat Genet*, 49, 993-1004.
- Baker, A. M., Cox, T. R., Bird, D., Lang, G., Murray, G. I., Sun, X. F., Southall, S. M., Wilson, J. R. & Erler, J. T. 2011. The role of lysyl oxidase in SRC-dependent proliferation and metastasis of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*, 103, 407-424.
- Barbazán, J., Muinelo-Romay, L., Vieito, M., Candamio, S., Díaz-López, A., Cano, A., Gómez-Tato, A., Casares de Cal, M., Abal, M. & López-López, R. 2014. A multimarker panel for circulating tumor cells detection predicts patient outcome and therapy response in metastatic colorectal cancer. *Int J Cancer*, 135, 2633-2643.
- Bardeesy, N., Bastian, B. C., Hezel, A., Pinkel, D., DePinho, R. A. & Chin, L. 2001. Dual inactivation of RB and p53 pathways in RAS-induced melanomas. *Mol Cell Biol*, 21, 2144-2153.
- Barker, H. E., Chang, J., Cox, T. R., Lang, G., Bird, D., Nicolau, M., Evans, H. R., Gartland, A. & Erler, J. T. 2011. LOXL2-mediated matrix remodeling in metastasis and mammary gland involution. *Cancer Res*, 71, 1561-1572.

- Barker, H. E., Cox, T. R. & Erler, J. T. 2012. The rationale for targeting the LOX family in cancer. *Nat Rev Cancer*, 12, 540-552.
- Barker, H. E., Bird, D., Lang, G. & Erler, J. T. 2013. Tumor-secreted LOXL2 activates fibroblasts through FAK signaling. *Mol Cancer Res*, 11, 1425-1436.
- Barry-Hamilton, V., Spangler, R., Marshall, D., McCauley, S., Rodriguez, H. M., Oyasu, M., Mikels, A., Vaysberg, M., Ghermazien, H., Wai, C., Garcia, C. A., Velayo, A. C., Jorgensen, B., Biermann, D., Tsai, D., Green, J., Zaffryar-Eilot, S., Holzer, A., Ogg, S., Thai, D., Neufeld, G., Van Vlasselaer, P. & Smith, V. 2010. Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment. *Nat Med*, 16, 1009-1017.
- Bartlett, E. K. 2019. Current management of regional lymph nodes in patients with melanoma. *J Surg Oncol*, 119, 200-207.
- Batlle, E., Sancho, E., Francí, C., Domínguez, D., Monfar, M., Baulida, J. & García de Herreros, A. 2000. The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nature Cell Biology*, 2, 84-89.
- Bennett, D. C. 2008. How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events? *Pigment Cell Melanoma Res*, 21, 27-38.
- Bignon, M., Pichol-Thievend, C., Hardouin, J., Malbouyres, M., Brechot, N., Nasciutti, L., Barret, A., Teillon, J., Guillon, E., Etienne, E., Caron, M., Joubert-Caron, R., Monnot, C., Ruggiero, F., Muller, L. & Germain, S. 2011. Lysyl oxidase-like protein-2 regulates sprouting angiogenesis and type IV collagen assembly in the endothelial basement membrane. *Blood*, 118, 3979-3989.
- Borel, A., Eichenberger, D., Farjanel, J., Kessler, E., Gleyzal, C., Hulmes, D. J., Sommer, P. & Font, B. 2001. Lysyl oxidase-like protein from bovine aorta. Isolation and maturation to an active form by bone morphogenetic protein-1. *J Biol Chem*, 276, 48944-48949.
- Bosenberg, M., Muthusamy, V., Curley, D. P., Wang, Z., Hobbs, C., Nelson, B., Nogueira, C., Horner, J. W., 2nd, Depinho, R. & Chin, L. 2006. Characterization of melanocyte-specific inducible Cre recombinase transgenic mice. *Genesis*, 44, 262-267.
- Brekhman, V., Lugassie, J., Zaffryar-Eilot, S., Sabo, E., Kessler, O., Smith, V., Golding, H. & Neufeld, G. 2011. Receptor activity modifying protein-3 mediates the protumorigenic activity of lysyl oxidase-like protein-2. *FASEB J*, 25, 55-65.
- Broome Powell, M., Gause, P. R., Hyman, P., Gregus, J., Lloria-Prevatt, M., Nagle, R. & Bowden, G. T. 1999. Induction of melanoma in TPras transgenic mice. *Carcinogenesis*, 20, 1747-1753.
- Burd, C. E., Liu, W., Huynh, M. V., Waqas, M. A., Gillahan, J. E., Clark, K. S., Fu, K., Martin, B. L., Jeck, W. R., Souroullas, G. P., Darr, D. B., Zedek, D. C., Miley, M. J., Baguley, B. C., Campbell, S. L. & Sharpless, N. E. 2014. Mutation-specific RAS oncogenicity explains NRAS codon 61 selection in melanoma. *Cancer Discov*, 4, 1418-1429.
- Cancer Genome Atlas, N. 2015. Genomic classification of cutaneous melanoma. *Cell*, 161, 1681-1696.
- Canesin, G., Cuevas, E. P., Santos, V., Lopez-Menendez, C., Moreno-Bueno, G., Huang, Y., Csiszar, K., Portillo, F., Peinado, H., Lyden, D. & Cano, A. 2015. Lysyl oxidase-like 2

- (LOXL2) and E47 EMT factor: novel partners in E-cadherin repression and early metastasis colonization. *Oncogene*, 34, 951-964.
- Cano, A., Pérez-Moreno, M., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., Del Barrio, M. G., Portillo, F. & Nieto, M. A. 2000. The transcription factor Snail controls epithelial–mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol*, 2, 76-83.
- Cano, A., G Santamaría, P. & Moreno-Bueno, G. 2012. LOXL2 in epithelial cell plasticity and tumor progression. *Future Oncol*, 9, 1095-1108.
- Caramel, J., Papadogeorgakis, E., Hill, L., Browne, G. J., Richard, G., Wierinckx, A., Saldanha, G., Osborne, J., Hutchinson, P., Tse, G., Lachuer, J., Puisieux, A., Pringle, J. H., Ansieau, S. & Tulchinsky, E. 2013. A switch in the expression of embryonic EMT-inducers drives the development of malignant melanoma. *Cancer Cell*, 24, 466-480.
- Cebria-Costa, J. P., Pascual-Reguant, L., Gonzalez-Perez, A., Serra-Bardenys, G., Querol, J., Cosin, M., Verde, G., Cigliano, R. A., Sanseverino, W., Segura-Bayona, S., Iturbide, A., Andreu, D., Nuciforo, P., Bernado-Morales, C., Rodilla, V., Arribas, J., Yelamos, J., de Herreros, A. G., Stracker, T. H. & Peiro, S. 2019. LOXL2-mediated H3K4 oxidation reduces chromatin accessibility in triple-negative breast cancer cells. *Oncogene*, doi: 10.1038/s41388-41019-40969-41381. .
- Cesarini, V., Guida, E., Todaro, F., Di Agostino, S., Tassinari, V., Nicolis, S., Favaro, R., Caporali, S., Lacal, P. M., Botti, E., Costanzo, A., Rossi, P., Jannini, E. A. & Dolci, S. 2017. Sox2 is not required for melanomagenesis, melanoma growth and melanoma metastasis in vivo. *Oncogene*, 36, 4508-4515.
- Chan, T. K., Alkaabi, M. K., ElBarky, A. M. & El-Hattab, A. W. 2019. LOXL3 novel mutation causing a rare form of autosomal recessive Stickler syndrome. *Clin Genet*, 95, 325-328.
- Chen, Y., Lu, X., Montoya-Durango, D. E., Liu, Y. H., Dean, K. C., Darling, D. S., Kaplan, H. J., Dean, D. C., Gao, L. & Liu, Y. 2017. ZEB1 regulates multiple oncogenic components involved in uveal melanoma progression. *Sci Rep*, 7:45, doi: 10.1038/s41598-41017-00079-x.
- Chin, L., Pomerantz, J., Polsky, D., Jacobson, M., Cohen, C., Cordon-Cardo, C., Horner II, J. W. & DePinho, R. A. 1997. Cooperative effects of INK4a and ras in melanoma susceptibility in vivo. *Genes Dev*, 11, 2822-2834.
- Chin, L., Pomerantz, J. & DePinho, R. A. 1998. The INK4a/ARF tumor suppressor: one gene – two products –two pathways. *Trends Biochem Sci*, 23, 291-296.
- Choi, S., Jeon, N., Choi, H., Shin, J., Jeong, H. & Lim, B. 2017. Lysyl oxidase-like 2 is expressed in kidney tissue and is associated with the progression of tubulointerstitial fibrosis. *Mol Med Rep*, 16, 2477-2482.
- Clark, W. H., Elder, D. E., Guerry, D., Epstein, M. N., Greene, M. H. & Van Horn, M. 1984. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol*, 15, 1147-1165.
- Contente, S., Kenyon, K., Rimoldi, D. & Friedman, R. M. 1990. Expression of gene rrg is associated with reversion of NIH 3T3 transformed by LTR-c-H-ras. *Science*, 249, 796-798.

- Cosgrove, D., Dufek, B., Meehan, D., Delimont, D., Hartnett, M., Samuelson, G., Gratton, M. A., Phillips, G., MacKenna, D. & Bain, G. 2018. Lysyl oxidase like-2 contributes to renal fibrosis in Col4a3/Alport mice. *Kidney Int*, 94, 303-314.
- Cox, T. R., Bird, D., Baker, A. M., Barker, H. E., Ho, M. W., Lang, G. & Erler, J. T. 2013. LOX-mediated collagen crosslinking is responsible for fibrosis-enhanced metastasis. *Cancer Res*, 73, 1721-1732.
- Cox, T. R., Rumney, R. M. H., Schoof, E. M., Perryman, L., Hoyer, A. M., Agrawal, A., Bird, D., Latif, N. A., Forrest, H., Evans, H. R., Huggins, I. D., Lang, G., Lindling, R., Gartland, A. & Erler, J. T. 2015. The hypoxic cancer secretome induces pre-metastatic bone lesions through lysyl oxidase. *Nature*, 522, 106-110.
- Cronshaw, A. D., Fothergill-Gilmore, L. A. & Hulmes, D. J. 1995. The proteolytic processing site of the precursor of lysyl oxidase. *Biochem J*, 306, 279-284.
- Crucioli, V. & Stilwell, J. 1982. The Histogenesis of malignant melanoma in relation to pre-existing pigmented lesions. *J Cutan Pathol*, 9, 396-404.
- Csiszar, K. 2001. Lysyl oxidases: A novel multifunctional amine oxidase family. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 70, 1-32.
- Cuevas, E. P., Moreno-Bueno, G., Canesin, G., Santos, V., Portillo, F. & Cano, A. 2014. LOXL2 catalytically inactive mutants mediate epithelial-to-mesenchymal transition. *Biol Open*, 3, 129-137.
- Cuevas, E. P., Eraso, P., Mazón, M. J., Santos, V., Moreno-Bueno, G., Cano, A. & Portillo, F. 2017. LOXL2 drives epithelial-mesenchymal transition via activation of IRE1-XBP1 signalling pathway. *Sci Rep*, 7:44988, doi: 10.1038/srep44988.
- Damsky, W., Curley, D. P., Santhanakrishnan, M., Rosenbaum, L. E., Platt, J. T., Gould Rothberg, B. E., Taketo, M. M., Dankort, D., Rimm, D. L., McMahon, M. & Bosenberg, M. 2011. beta-catenin signaling controls metastasis in Braf-activated Pten-deficient melanomas. *Cancer Cell*, 20, 741-754.
- Damsky, W., Micevic, G., Meeth, K., Muthusamy, V., Curley, D. P., Santhanakrishnan, M., Erdelyi, I., Platt, J. T., Huang, L., Theodosakis, N., Zaidi, M. R., Tighe, S., Davies, M. A., Dankort, D., McMahon, M., Merlino, G., Bardeesy, N. & Bosenberg, M. 2015. mTORC1 activation blocks BrafV600E-induced growth arrest but is insufficient for melanoma formation. *Cancer Cell*, 27, 41-56.
- Dankort, D., Filenova, E., Collado, M., Serrano, M., Jones, K. & McMahon, M. 2007. A new mouse model to explore the initiation, progression, and therapy of BRAFV600E-induced lung tumors. *Genes Dev*, 21, 379-384.
- Dankort, D., Curley, D. P., Cartlidge, R. A., Nelson, B., Karnezis, A. N., Damsky, W. E., Jr., You, M. J., DePinho, R. A., McMahon, M. & Bosenberg, M. 2009. Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nat Genet*, 41, 544-552.
- De Fabo, E. C., Noonan, F. P., Fears, T. & Merlino, G. 2004. Ultraviolet B but not ultraviolet A radiation initiates melanoma. *Cancer Res*, 64, 6372-6376.
- Denecker, G., Vandamme, N., Akay, O., Koludrovic, D., Taminiau, J., Lemeire, K., Gheldof, A., De Craene, B., Van Gele, M., Brochez, L., Udupi, G. M., Rafferty, M., Balint, B., Gallagher, W. M., Ghanem, G., Huylebroeck, D., Haigh, J., van den Oord, J., Larue, L., Davidson, I., Marine, J. C. & Berx, G. 2014. Identification of a ZEB2-MITF-ZEB1

- transcriptional network that controls melanogenesis and melanoma progression. *Cell Death Differ*, 21, 1250-1261.
- Dhomen, N., Reis-Filho, J. S., da Rocha Dias, S., Hayward, R., Savage, K., Delmas, V., Larue, L., Pritchard, C. & Marais, R. 2009. Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. *Cancer Cell*, 15, 294-303.
- Dhomen, N., Da Rocha Dias, S., Hayward, R., Ogilvie, L., Hedley, D., Delmas, V., McCarthy, A., Henderson, D., Springer, C. J., Pritchard, C., Larue, L. & Marais, R. 2010. Inducible expression of (V600E) Braf using tyrosinase-driven Cre recombinase results in embryonic lethality. *Pigment Cell Melanoma Res*, 23, 112-120.
- Dongre, A. & Weinberg, R. A. 2019. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20, 69-84.
- Dufresne, J., Bowden, P., Thavarajah, T., Florentinus-Mefailoski, A., Chen, Z., Tucholska, M., Norzin, T., Truc Ho, M., Phan, M., Mohamed, N., Ravandi, A., Stanton, E., Slutsky, A., dos Santos, C., Romaschin, A., Marshall, J., Addison, C., Malone, S., Heyland, D., Scheltens, P., Killestein, J., Teunissen, C., Diamandis, E., Siu, K. & Marshall, J. G. 2018. The plasma peptides of ovarian cancer. *Clin Proteom*, 15, doi: 10.1186/s12014-12018-19215-z. eCollection 2018.
- Erler, J. T., Bennewith, K. L., Nicolau, M., Dornhofer, N., Kong, C., Le, Q. T., Chi, J. T., Jeffrey, S. S. & Giaccia, A. J. 2006. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature*, 440, 1222-1226.
- Erler, J. T., Bennewith, K. L., Cox, T. R., Lang, G., Bird, D., Koong, A., Le, Q. T. & Giaccia, A. J. 2009. Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer Cell*, 15, 35-44.
- Fickert, P. 2019. Is This the Last Requiem for Simtuzumab? *Hepatology*, 69, 476-479.
- Fidler, I. J. 1973. Selection of successive tumour lines for metastasis. *Nat New Biol*, 242, 148-149.
- Floristán, A. 2015. *Estudio funcional de la proteína lisil oxidasa-like 3: modelos animales y progresión tumoral*. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid.
- Gaffal, E., Landsberg, J., Bald, T., Sporleder, A., Kohlmeyer, J. & Tuting, T. 2011. Neonatal UVB exposure accelerates melanoma growth and enhances distant metastases in Hgf-Cdk4(R24C) C57BL/6 mice. *Int J Cancer*, 129, 285-294.
- Gambichler, T. & Skrygan, M. 2013. Decreased lysyl oxidase-like 2 expression in mid-dermal elastolysis. *Arch Dermatol Res*, 305, 359-363.
- Gambichler, T., Skrygan, M., Reininghaus, L., Schulze, H. J., Schaller, J., Hessam, S., Colato, C., Girolomoni, G. & Heitzer, E. 2016. Lysyl oxidase-like 2 promoter hypermethylation in mid-dermal elastolysis. *Br J Dermatol*, 175, 1354-1356.
- Gambichler, T., Mahjurián-Namari, M., Reininghaus, L., Schmitz, L., Skrygan, M., Schulze, H. J., Schaller, J. & Girolomoni, G. 2019. Lysyl oxidase-like-2 mutations and reduced mRNA and protein expression in mid-dermal elastolysis. *Clin Exp Dermatol*, 44, 47-51.
- Giampuzzi, M., Botti, G., Di Duca, M., Arata, L., Ghiggeri, G., Gusmano, R., Ravazzolo, R. & Di Donato, A. 2000. Lysyl oxidase activates the transcription activity of human

- collagene III promoter. Possible involvement of Ku antigen. *J Biol Chem*, 275, 36341-36349.
- Giampuzzi, M., Botti, G., Cilli, M., Gusmano, R., Borel, A., Sommer, P. & Di Donato, A. 2001. Down-regulation of lysyl oxidase-induced tumorigenic transformation in NRK-49F cells characterized by constitutive activation of ras proto-oncogene. *J Biol Chem*, 276, 29226-29232.
- Giampuzzi, M., Oleggini, R. & Di Donato, A. 2003. Altered adhesion features and signal transduction in NRK-49F cells transformed by down-regulation of lysyl oxidase. *Biochim Biophys Acta*, 1647, 239-244.
- Gilad, G. M., Kagan, H. M. & Gilad, V. H. 2005. Evidence for increased lysyl oxidase, the extracellular matrix-forming enzyme, in Alzheimer's disease brain. *Neurosci Lett*, 376, 210-214.
- Goel, V. K., Ibrahim, N., Jiang, G., Singhal, M., Fee, S., Flotte, T., Westmoreland, S., Haluska, F. S., Hinds, P. W. & Haluska, F. G. 2009. Melanocytic nevus-like hyperplasia and melanoma in transgenic BRAFV600E mice. *Oncogene*, 28, 2289-2298.
- Goldstein, A. M., Chan, M., Harland, M., Gillanders, E. M., Hayward, N. K., Avril, M. F., Azizi, E., Bianchi-Scarra, G., Bishop, D. T., Bressac-de Paillerets, B., Bruno, W., Calista, D., Cannon Albright, L. A., Demenais, F., Elder, D. E., Ghiorzo, P., Gruis, N. A., Hansson, J., Hogg, D., Holland, E. A., Kanetsky, P. A., Kefford, R. F., Landi, M. T., Lang, J., Leachman, S. A., Mackie, R. M., Magnusson, V., Mann, G. J., Niendorf, K., Newton Bishop, J., Palmer, J. M., Puig, S., Puig-Buttille, J. A., de Snoo, F. A., Stark, M., Tsao, H., Tucker, M. A., Whitaker, L., Yakobson, E. & Melanoma Genetics, C. 2006. High-risk melanoma susceptibility genes and pancreatic cancer, neural system tumors, and uveal melanoma across GenoMEL. *Cancer Res*, 66, 9818-9828.
- Grau-Bove, X., Ruiz-Trillo, I. & Rodriguez-Pascual, F. 2015. Origin and evolution of lysyl oxidases. *Sci Rep*, 5, doi: 10.1038/srep10568.
- Griewank, K. G., Scolyer, R. A., Thompson, J. F., Flaherty, K. T., Schadendorf, D. & Murali, R. 2014. Genetic alterations and personalized medicine in melanoma: progress and future prospects. *J Natl Cancer Inst*, 106, doi: 10.1093/jnci/djt1435.
- Grimsby, J. L., Lucero, H. A., Trackman, P. C., Ravid, K. & Kagan, H. M. 2010. Role of lysyl oxidase propeptide in secretion and enzyme activity. *J Cell Biochem*, 111, 1231-1243.
- Guo, D. C., Regalado, E. S., Gong, L., Duan, X., Santos-Cortez, R. L., Arnaud, P., Ren, Z., Cai, B., Hostetler, E. M., Moran, R., Liang, D., Estrera, A., Safi, H. J., University of Washington Center for Mendelian, G., Leal, S. M., Bamshad, M. J., Shendure, J., Nickerson, D. A., Jordeau, G., Boileau, C. & Milewicz, D. M. 2016. LOX Mutations Predispose to Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections. *Circ Res*, 118, 928-934.
- Gupta, G. P. & Massague, J. 2006. Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, 127, 679-695.
- Hacker, E., Muller, H. K., Irwin, N., Gabrielli, B., Lincoln, D., Pavey, S., Powell, M. B., Malumbres, M., Barbacid, M., Hayward, N. & Walker, G. 2006. Spontaneous and UV radiation-induced multiple metastatic melanomas in Cdk4R24C/R24C/TPras mice. *Cancer Res*, 66, 2946-2952.

- Hajdu, I., Kardos, J., Major, B., Fabo, G., Lorincz, Z., Cseh, S. & Dorman, G. 2018. Inhibition of the LOX enzyme family members with old and new ligands. Selectivity analysis revisited. *Bioorg Med Chem Lett*, 28, 3113-3118.
- Handorf, A. M., Zhou, Y., Halanski, M. A. & Li, W. J. 2015. Tissue stiffness dictates development, homeostasis, and disease progression. *Organogenesis*, 11, doi: 10.1080/15476278.15472015.11019687.
- Harrison, S. A., Abdelmalek, M. F., Caldwell, S., Shiffman, M. L., Diehl, A. M., Ghalib, R., Lawitz, E. J., Rockett, D. C., Schall, R. A., Jia, C., McColgan, B. J., McHutchison, J. G., Subramanian, G. M., Myers, R. P., Younossi, Z., Ratziu, V., Muir, A. J., Afdhal, N. H., Goodman, Z., Bosch, J., Sanyal, A. J., Gs, U. S. & Investigators, G.-U.-. 2018. Simtuzumab Is Ineffective for Patients With Bridging Fibrosis or Compensated Cirrhosis Caused by Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*, 155, 1140-1153.
- Hayashi, K., Fong, K. S., Mercier, F., D., B. C., Csiszar, K. & Hayashi, M. 2004. Comparative immunocytochemical localization of lysyl oxidase (LOX) and the lysyl oxidase-like (LOXL) proteins: changes in the expression of LOXL during development and growth of mouse tissues. *J Mol Histol*, 35, 845-855.
- Held, M. A., Curley, D. P., Dankort, D., McMahon, M., Muthusamy, V. & Bosenberg, M. W. 2010. Characterization of melanoma cells capable of propagating tumors from a single cell. *Cancer Res*, 70, 388-397.
- Hodis, E., Watson, I. R., Kryukov, G. V., Arold, S. T., Imielinski, M., Theurillat, J. P., Nickerson, E., Auclair, D., Li, L., Place, C., Dicara, D., Ramos, A. H., Lawrence, M. S., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Voet, D., Saksena, G., Stransky, N., Onofrio, R. C., Winckler, W., Ardlie, K., Wagle, N., Wargo, J., Chong, K., Morton, D. L., Stemke-Hale, K., Chen, G., Noble, M., Meyerson, M., Ladbury, J. E., Davies, M. A., Gershenwald, J. E., Wagner, S. N., Hoon, D. S., Schadendorf, D., Lander, E. S., Gabriel, S. B., Getz, G., Garraway, L. A. & Chin, L. 2012. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell*, 150, 251-263.
- Hooijkaas, A. I., Gadiot, J., van der Valk, M., Mooi, W. J. & Blank, C. U. 2012. Targeting BRAFV600E in an inducible murine model of melanoma. *Am J Pathol*, 181, 785-794.
- Hornstra, I. K., Birge, S., Starcher, B., Bailey, A. J., Mecham, R. P. & Shapiro, S. D. 2003. Lysyl oxidase is required for vascular and diaphragmatic development in mice. *J Biol Chem*, 278, 14387-14393.
- Huang, H., Song, T. J., Li, X., Hu, L., He, Q., Liu, M., Lane, M. D. & Tang, Q. Q. 2009. BMP signaling pathway is required for commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 12670-12665.
- Huang, Z., Du, S., Huang, L., Li, J., Xiao, L. & Tong, P. 2016. Leptin promotes apoptosis and inhibits autophagy of chondrocytes through upregulating Lysyl oxidase-like 3 during osteoarthritis pathogenesis. *Osteoarthritis Cartilage*, 24, 1246-1253.
- Hutchinson, J. H., Rowbottom, M. W., Lonergan, D., Darlington, J., Prodanovich, P., King, C. D., Evans, J. F. & Bain, G. 2017. Small Molecule Lysyl Oxidase-like 2 (LOXL2) Inhibitors: The Identification of an Inhibitor Selective for LOXL2 over LOX. *ACS Med Chem Lett*, 8, 423-427.

- Iturbide, A., Pascual-Reguant, L., Fargas, L., Cebria, J. P., Alsina, B., Garcia de Herreros, A. & Peiro, S. 2015. LOXL2 Oxidizes Methylated TAF10 and Controls TFIID-Dependent Genes during Neural Progenitor Differentiation. *Mol Cell*, 58, 755-766.
- Jakob, J. A., Bassett, R. L., Jr., Ng, C. S., Curry, J. L., Joseph, R. W., Alvarado, G. C., Rohlf, M. L., Richard, J., Gershenwald, J. E., Kim, K. B., Lazar, A. J., Hwu, P. & Davies, M. A. 2012. NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. *Cancer*, 118, 4014-4023.
- Jansen, M. J. & Csiszar, K. 2007. Intracellular localization of the extracellular matrix enzyme lysyl oxidase in polarized epithelial cells. *Matrix Biol*, 26, 136-139.
- Jensen, B., Spicer, D. E., Sheppard, M. N. & Anderson, R. H. 2017. Development of the atrial septum in relation to postnatal anatomy and interatrial communications. *Heart*, 103, 456-462.
- Jeong, C. & Kim, Y. 2017. LOXL3-sv2, a novel variant of human lysyl oxidase-like 3 (LOXL3), functions as an amine oxidase. *Int J Mol Med*, 39, 719-724.
- Jourdan-Le Saux, C., Tomsche, A., Ujfalusi, A., Jia, L. & Csiszar, K. 2001. Central nervous system, uterus, heart, and leukocyte expression of the LOXL3 gene, encoding a novel lysyl oxidase-like protein. *Genomics*, 74, 211-228.
- Kadzik, R. S., Cohen, E. D., Morley, M. P., Stewart, K. M., Lu, M. M. & Morrissey, E. E. 2014. Wnt ligand/Frizzled 2 receptor signaling regulates tube shape and branch-point formation in the lung through control of epithelial cell shape. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 12444-12449.
- Kagan, H. M., Williams, M. A., Calaman, S. D. & Berkowitz, E. M. 1983. Histone H1 is a substrate for lysyl oxidase and contains endogenous sodium borotritide-reducible residues. *Biochem Biophys Res Commun*, 115, 186-192.
- Kagan, H. M. 1994. Lysyl Oxidase: Mechanism, Regulation and Relationship to Liver Fibrosis. *Pathol Res Pract*, 190, 910-919.
- Kagan, H. M. & Li, W. 2003. Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *J Cell Biochem*, 88, 660-672.
- Kai, F., Drain, A. P. & Weaver, V. M. 2019. The Extracellular Matrix Modulates the Metastatic Journey. *Dev Cell*, 49, 332-346.
- Kaplan, R. N., Riba, R. D., Zacharoulis, S., Bramley, A. H., Vincent, L., Costa, C., MacDonald, D. D., Jin, D. K., Shido, K., Kerns, S. A., Zhu, Z., Hicklin, D., Wu, Y., Port, J. L., Altorki, N., Port, E. R., Ruggero, D., Shmelkov, S. V., Jensen, K. K., Rafii, S. & Lyden, D. 2005. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*, 438, 820-827.
- Kasashima, H., Yashiro, M., Kinoshita, H., Fukuoka, T., Morisaki, T., Masuda, G., Sakurai, K., Kubo, N., Ohira, M. & Hirakawa, K. 2014. Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) from stromal fibroblasts stimulates the progression of gastric cancer. *Cancer Lett*, 354, 438-446.
- Kasashima, H., Yashiro, M., Okuno, T., Miki, Y., Kitayama, K., Masuda, G., Kinoshita, H., Morisaki, T., Fukuoka, T., Hasegawa, T., Sakurai, K., Toyokawa, T., Kubo, N., Tanaka, H., Muguruma, K., Hirakawa, K. & Ohira, M. 2018. Significance of the Lysyl Oxidase Members Lysyl Oxidase Like 1, 3, and 4 in Gastric Cancer. *Digestion*, 98, 238-248.

- Kato, M., Takahashi, M., Akhand, A. A., Liu, W., Dai, Y., Shimizu, S., Iwamoto, T., Suzuki, H. & Nakashima, I. 1998. Transgenic mouse model for skin malignant melanoma. *Oncogene*, 17, 1885-1888.
- Kaufman, C. K., Mosimann, C., Fan, Z. P., Yang, S., Thomas, A. J., Ablain, J., Tan, J. L., Fogley, R. D., van Rooijen, E., Hagedorn, E. J., Ciarlo, C., White, R. M., Matos, D. A., Puller, A. C., Santoriello, C., Liao, E. C., Young, R. A. & Zon, L. I. 2016. A zebrafish melanoma model reveals emergence of neural crest identity during melanoma initiation. *Science*, 351, doi: 10.1126/science.aad2197.
- Kenyon, K., Contente, S., Trackman, P., Tang, J., Kagan, H. & Friedman, R. 1991. Lysyl oxidase and rrg messenger RNA. *Science*, 253, 802-802.
- Khakoo, A., Thomas, R., Trompeter, R., Duffy, P., Price, R. & Pope, F. M. 1997. Congenital cutis laxa and lysyl oxidase deficiency. *Clin Genet*, 51, 109-114.
- Khan, M. F. J., Little, J., Mossey, P. A., Steegers-Theunissen, R. P. M., Bonsi, M., Bassi Andreasi, R. & Rubini, M. 2018. Association between a common missense variant in LOXL3 gene and the risk of non-syndromic cleft palate. *Congenit Anom (Kyoto)*, 58, 136-140.
- Klein-Szanto, A., Silvers, W. K. & Mintz, B. 1994. Ultraviolet Radiation-induced Malignant Skin Melanoma in Melanoma-susceptible Transgenic Mice. *Cancer Res*, 54, 4569-4572.
- Kohler, C., Nittner, D., Rambow, F., Radaelli, E., Stanchi, F., Vandamme, N., Baggiolini, A., Sommer, L., Berx, G., van den Oord, J. J., Gerhardt, H., Blanpain, C. & Marine, J. C. 2017. Mouse cutaneous melanoma induced by mutant BRAf arises from expansion and dedifferentiation of mature pigmented melanocytes. *Cell Stem Cell*, 21, 679-693.
- Kraft-Sheleg, O., Zaffryar-Eilot, S., Genin, O., Yaseen, W., Soueid-Baumgarten, S., Kessler, O., Smolkin, T., Akiri, G., Neufeld, G., Cinnamon, Y. & Hasson, P. 2016. Localized LoxL3-dependent fibronectin oxidation regulates myofiber stretch and integrin-mediated adhesion. *Dev Cell*, 36, 550-561.
- Kuivaniemi, H., Peltonen, L. & Kivirikko, K. 1985. Type IX Ehlers-Danlos syndrome and Menkes syndrome: the decrease in lysyl oxidase activity is associated with a corresponding deficiency in the enzyme protein. *Am J Hum Genet*, 37, 798-808.
- Kumar, R., Angelini, S., Snellman, E. & Hemminki, K. 2004. BRAF mutations are common somatic events in melanocytic nevi. *J Invest Dermatol*, 122, 342-348.
- Kwong, L. N., Costello, J. C., Liu, H., Jiang, S., Helms, T. L., Langsdorf, A. E., Jakubosky, D., Genovese, G., Muller, F. L., Jeong, J. H., Bender, R. P., Chu, G. C., Flaherty, K. T., Wargo, J. A., Collins, J. J. & Chin, L. 2012. Oncogenic NRAS signaling differentially regulates survival and proliferation in melanoma. *Nat Med*, 18, 1503-1510.
- Lai, X., Wichers, H., Soler-Lopez, M. & Dijkstra, B. 2017. Structure and function of human tyrosinase and tyrosinase-related proteins. *Chem Eur J*, 10, doi: 10.1002/chem.201704410. .
- Lamouille, S., Xu, J. & Derynck, R. 2014. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 178-196.

- Laurentino, T. S., Soares, R. D. S., Marie, S. K. N. & Oba-Shinjo, S. M. 2019. LOXL3 function beyond amino oxidase and role in pathologies, including cancer. *Int J Mol Sci*, 20, doi: 10.3390/ijms20143587.
- Laurette, P., Coassolo, S., Davidson, G., Michel, I., Gambi, G., Yao, W., Sohler, P., Li, M., Mengus, G., Larue, L. & Davidson, I. 2019. Chromatin remodellers Brg1 and Bptf are required for normal gene expression and progression of oncogenic Braf-driven mouse melanoma. *Cell Death Differ*, doi: 10.1038/s41418-41019-40333-41416. .
- Lawrence, M. S., Stojanov, P., Polak, P., Kryukov, G. V., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Carter, S. L., Stewart, C., Mermel, C. H., Roberts, S. A., Kiezun, A., Hammerman, P. S., McKenna, A., Drier, Y., Zou, L., Ramos, A. H., Pugh, T. J., Stransky, N., Helman, E., Kim, J., Sougnez, C., Ambrogio, L., Nickerson, E., Shefler, E., Cortes, M. L., Auclair, D., Saksena, G., Voet, D., Noble, M., DiCara, D., Lin, P., Lichtenstein, L., Heiman, D. I., Fennell, T., Imielinski, M., Hernandez, B., Hodis, E., Baca, S., Dulak, A. M., Lohr, J., Landau, D. A., Wu, C. J., Melendez-Zajgla, J., Hidalgo-Miranda, A., Koren, A., McCarroll, S. A., Mora, J., Crompton, B., Onofrio, R., Parkin, M., Winckler, W., Ardlie, K., Gabriel, S. B., Roberts, C. W. M., Biegel, J. A., Stegmaier, K., Bass, A. J., Garraway, L. A., Meyerson, M., Golub, T. R., Gordenin, D. A., Sunyaev, S., Lander, E. S. & Getz, G. 2013. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*, 499, 214-218.
- Lee, J. E. & Kim, Y. 2006. A tissue-specific variant of the human lysyl oxidase-like protein 3 (LOXL3) functions as an amine oxidase with substrate specificity. *J Biol Chem*, 281, 37282-37290.
- Lee, U. J., Gustilo-Ashby, A. M., Daneshgari, F., Kuang, M., Vurbic, D., Lin, D. L., Flask, C. A., Li, T. & Damaser, M. S. 2008. Lower urogenital tract anatomical and functional phenotype in lysyl oxidase like-1 knockout mice resembles female pelvic floor dysfunction in humans. *Am J Physiol Renal Physiol*, 295, 545-555.
- Lee, V. S., Halabi, C. M., Hoffman, E. P., Carmichael, N., Leshchiner, I., Lian, C. G., Bierhals, A. J., Vuzman, D., Brigham Genomic, M., Mecham, R. P., Frank, N. Y. & Stitzel, N. O. 2016. Loss of function mutation in LOX causes thoracic aortic aneurysm and dissection in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, 8759-8764.
- Lesche, R., Groszer, M., Gao, J., Wang, Y., Messing, A., Sun, H., Liu, X. & Wu, H. 2002. Cre/loxP-mediated inactivation of the murine Pten tumor suppressor gene. *Genesis*, 32, 148-149.
- Levental, K. R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J. N., Egeblad, M., Erler, J. T., Fong, S. F., Csiszar, K., Giaccia, A., Weninger, W., Yamauchi, M., Gasser, D. L. & Weaver, V. M. 2009. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*, 139, 891-906.
- Li, J., Gao, B., Xiao, X., Li, S., Jia, X., Sun, W., Guo, X. & Zhang, Q. 2016. Exome sequencing identified null mutations in LOXL3 associated with early-onset high myopia. *Mol Vis*, 22, 161-167.
- Li, P.-A., He, Q., Cao, T., Yong, G., Szauter, K. M., Fong, K. S. K., Karlsson, J., Keep, M. F. & Csiszar, K. 2004. Up-regulation and altered distribution of lysyl oxidase in the central

- nervous system of mutant SOD1 transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Brain Res*, 120, 115-122.
- Li, R., Wang, Y., Zhang, X., Feng, M., Ma, J., Li, J., Yang, X., Fang, F., Xia, Q., Zhang, Z., Shang, M. & Jiang, S. 2019. Exosome-mediated secretion of LOXL4 promotes hepatocellular carcinoma cell invasion and metastasis. *Mol Cancer*, 18, doi: 10.1186/s12943-12019-10948-12948.
- Li, W., Nellaiappan, K., Strassmaier, T., Graham, L., Thomas, K. M. & Kagan, H. M. 1997. Localization and activity of lysyl oxidase within nuclei of fibrogenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 12817-12822.
- Li, W., Liu, G., Chou, I. & Kagan, H. M. 2000. Hydrogen Peroxide-Mediated, Lysyl Oxidase-Dependent Chemotaxis of Vascular Smooth Muscle Cells. *J Cell Biochem*, 78, 550-557.
- Lito, P., Pratilas, C. A., Joseph, E. W., Tadi, M., Halilovic, E., Zubrowski, M., Huang, A., Wong, W. L., Callahan, M. K., Merghoub, T., Wolchok, J. D., de Stanchina, E., Chandralapaty, S., Poulikakos, P. I., Fagin, J. A. & Rosen, N. 2012. Relief of profound feedback inhibition of mitogenic signaling by RAF inhibitors attenuates their activity in BRAFV600E melanomas. *Cancer Cell*, 22, 668-682.
- Liu, W., Monahan, K. B., Pfefferle, A. D., Shimamura, T., Sorrentino, J., Chan, K. T., Roadcap, D. W., Ollila, D. W., Thomas, N. E., Castrillon, D. H., Miller, C. R., Perou, C. M., Wong, K. K., Bear, J. E. & Sharpless, N. E. 2012. LKB1/STK11 inactivation leads to expansion of a prometastatic tumor subpopulation in melanoma. *Cancer Cell*, 21, 751-764.
- Liu, X., Zhao, Y., Gao, J., Pawlyk, B., Starcher, B., Spencer, J. A., Yanagisawa, H., Zuo, J. & Li, T. 2004. Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. *Nat Genet*, 36, 178-182.
- Lopez-Jimenez, A. J., Basak, T. & Vanacore, R. M. 2017. Proteolytic processing of lysyl oxidase-like-2 in the extracellular matrix is required for crosslinking of basement membrane collagen IV. *J Biol Chem*, 292, 16970-16982.
- Lucero, H. A. & Kagan, H. M. 2006. Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cell Mol Life Sci*, 63, 2304-2316.
- Lugassy, J., Zaffryar-Eilot, S., Soueid, S., Mordoviz, A., Smith, V., Kessler, O. & Neufeld, G. 2012. The enzymatic activity of lysyl oxidase-like-2 (LOXL2) is not required for LOXL2-induced inhibition of keratinocyte differentiation. *J Biol Chem*, 287, 3541-3549.
- Lv, G. Q., Zou, H. Y., Liao, L. D., Cao, H. H., Zeng, F. M., Wu, B. L., Xie, J. J., Fang, W. K., Xu, L. Y. & Li, E. M. 2014. Identification of a novel lysyl oxidase-like 2 alternative splicing isoform, LOXL2 Deltae13, in esophageal squamous cell carcinoma. *Biochem Cell Biol*, 92, 379-389.
- Ma, L., Huang, C., Wang, X. J., Xin, D. E., Wang, L. S., Zou, Q. C., Zhang, Y. S., Tan, M. D., Wang, Y. M., Zhao, T. C., Chatterjee, D., Altura, R. A., Wang, C., Xu, Y. S., Yang, J. H., Fan, Y. S., Han, B. H., Si, J., Zhang, X., Cheng, J., Chang, Z. & Chin, Y. E. 2017. Lysyl oxidase 3 is a dual-specificity enzyme involved in STAT3 deacetylation and deacetylimination modulation. *Mol Cell*, 65, 296-309.
- Maki, J., Räsänen, J., Tikkanen, H., Sormunen, R., Mäkilä, K., Kivirikko, K. & Soininen, R. 2002. Inactivation of the Lysyl Oxidase Gene Lox Leads to Aortic Aneurysms,

- Cardiovascular Dysfunction, and Perinatal Death in Mice. *Circulation*, 106, 2503-2509.
- Maki, J., Sormunen, R., Lippo, S., Kaarteenaho-Wiik, R., Soininen, R. & Myllyharju, J. 2005. Lysyl oxidase is essential for normal development and function of the respiratory system and for the integrity of elastic and collagen fibers in various tissues. *Am J Pathol*, 167, 927-936.
- Maki, J. 2009. Lysyl oxidases in mammalian development and certain pathological conditions. *Histol Histopathol*, 24, 651-660.
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C. C., Shipitsin, M., Campbell, L. L., Polyak, K., Briskin, C., Yang, J. & Weinberg, R. A. 2008. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133, 704-715.
- Martin, A., Salvador, F., Moreno-Bueno, G., Floristan, A., Ruiz-Herguido, C., Cuevas, E. P., Morales, S., Santos, V., Csiszar, K., Dubus, P., Haigh, J. J., Bigas, A., Portillo, F. & Cano, A. 2015. Lysyl oxidase-like 2 represses Notch1 expression in the skin to promote squamous cell carcinoma progression. *EMBO J*, 34, 1090-1109.
- Massi, G. & LeBoit, P. 2014. *Histological diagnosis of Nevi and Melanoma, Second Edition*, Springer Heidelberg London New York Dordrecht.
- Meeth, K., Wang, J., Micevic, G., Damsky, W. & Bosenberg, M. 2016. The YUMM lines: a series of congenic mouse melanoma cell lines with defined genetic alterations. *Pigment Cell Melanoma Res*, 29, 590-597.
- Meissner, E., McLaughlin, M., Matthews, L., Gharib, A., Wood, B., Levy, E., Sinkus, R., Virtaneva, K., Sturdevant, D., Martens, C., Porcella, S., Goodman, Z., Kanwar, B., Myers, R. P., Subramanian, M., Hadigan, C., Masur, H., Kleiner, D., Heller, T., Kottlil, S., Kovacs, J. & Morse, C. 2016. Simtuzumab treatment of advanced liver fibrosis in HIV and HCV-infected adults: Results of a 6-month open-label safety trial. *Liver Int*, 36, 1783-1792.
- Melnikova, V. O., Bolshakov, S. V., Walker, C. & Ananthaswamy, H. N. 2004. Genomic alterations in spontaneous and carcinogen-induced murine melanoma cell lines. *Oncogene*, 23, 2347-2356.
- Merlino, G., Herlyn, M., Fisher, D. E., Bastian, B. C., Flaherty, K. T., Davies, M. A., Wargo, J. A., Curiel-Lewandrowski, C., Weber, M. J., Leachman, S. A., Soengas, M. S., McMahon, M., Harbour, J. W., Swetter, S. M., Aplin, A. E., Atkins, M. B., Bosenberg, M. W., Dummer, R., Gershenwald, J. E., Halpern, A. C., Herlyn, D., Karakousis, G. C., Kirkwood, J. M., Krauthammer, M., Lo, R. S., Long, G. V., McArthur, G., Ribas, A., Schuchter, L., Sosman, J. A., Smalley, K. S., Steeg, P., Thomas, N. E., Tsao, H., Tueting, T., Weeraratna, A., Xu, G., Lomax, R., Martin, A., Silverstein, S., Turnham, T. & Ronai, Z. A. 2016. The state of melanoma: challenges and opportunities. *Pigment Cell Melanoma Res*, 29, 404-416.
- Millanes-Romero, A., Herranz, N., Perrera, V., Iturbide, A., Loubat-Casanovas, J., Gil, J., Jenuwein, T., Garcia de Herreros, A. & Peiro, S. 2013. Regulation of heterochromatin transcription by Snail1/LOXL2 during epithelial-to-mesenchymal transition. *Mol Cell*, 52, 746-757.

- Miller, A. J. & Mihm, M. C. 2006. Melanoma. *N Engl J Med*, 355, 51-65.
- Moon, H., Donahue, L. R., Choi, E., Scumpia, P. O., Lowry, W. E., Grenier, J. K., Zhu, J. & White, A. C. 2017. Melanocyte stem cell activation and translocation initiate cutaneous melanoma in response to UV exposure. *Cell Stem Cell*, 21, 665-678.
- Moon, H. J., Finney, J., Xu, L., Moore, D., Welch, D. R. & Mure, M. 2013. MCF-7 cells expressing nuclear associated lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) exhibit an epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) phenotype and are highly invasive in vitro. *J Biol Chem*, 288, 30000-30008.
- Morel, A. P., Lievre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S. & Puisieux, A. 2008. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*, 3, doi: 10.1371/journal.pone.0002888.
- Moreno-Bueno, G., Peinado, H., Molina, P., Olmeda, D., Cubillo, E., Santos, V., Palacios, J., Portillo, F. & Cano, A. 2009. The morphological and molecular features of the epithelial-to-mesenchymal transition. *Nat Protoc*, 4, 1591-1613.
- Moreno-Bueno, G., Salvador, F., Martin, A., Floristan, A., Cuevas, E. P., Santos, V., Montes, A., Morales, S., Castilla, M. A., Rojo-Sebastian, A., Martinez, A., Hardisson, D., Csiszar, K., Portillo, F., Peinado, H., Palacios, J. & Cano, A. 2011. Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2), a new regulator of cell polarity required for metastatic dissemination of basal-like breast carcinomas. *EMBO Mol Med*, 3, 528-544.
- Müller, J., Krijgsman, O., Tsoi, J., Robert, L., Hugo, W., Song, C., Kong, X., Possik, P. A., Cornelissen-Steijger, P. D. M., Foppen, M. H. G., Kemper, K., Goding, C. R., McDermott, U., Blank, C., Haanen, J., Graeber, T. G., Ribas, A., Lo, R. S. & Peeper, D. S. 2014. Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nat Commun*, 5, doi: 10.1038/ncomms6712.
- Naba, A., Clauser, K. R., Hoersch, S., Liu, H., Carr, S. & Hynes, R. 2012. The matrisome: in silico definition and in vivo characterization by proteomics of normal and tumor extracellular matrices. *Mol Cell Proteomics*, 11, doi: 10.1074/mcp.M1111.014647. .
- Nakajima, A., C, F. S., Gulka, A. O. D. & Hanai, J. I. 2018. TGF-beta signaling and the epithelial-mesenchymal transition during palatal fusion. *Int J Mol Sci*, 19, doi: 10.3390/ijms19113638.
- Nellaippan, K., Risitano, A., Liu, G., Niclas, G. & Kagan, H. M. 2000. Fully processed lysyl oxidase catalyst translocates from the extracellular space into nuclei of aortic smooth-muscle cells. *J Cell Biochem*, 79, 576-582.
- Nichol, P. F., Corliss, R. F., Yamada, S., Shiota, K. & Saijoh, Y. 2012. Muscle patterning in mouse and human abdominal wall development and omphalocele specimens of humans. *Anat Rec*, 295, 2129-2140.
- Nieto, M. A. & Cano, A. 2012. The epithelial-mesenchymal transition under control: global programs to regulate epithelial plasticity. *Semin Cancer Biol*, 22, 361-368.
- Nieto, M. A., Huang, R. Y., Jackson, R. A. & Thiery, J. P. 2016. EMT: 2016. *Cell*, 166, 21-45.
- NIH. 2019a. PDQ® Adult Treatment Editorial Board. PDQ Melanoma Treatment. Bethesda, MD: National Cancer Institute [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/types/skin/hp/melanoma-treatment-pdq#link/775> [Accessed 09/04/2019 2019].

- NIH. 2019b. *SEER Cancer Stat Facts: Melanoma of the Skin*. National Cancer Institute. Bethesda, MD: National Cancer Institute [Online]. Available: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html> [Accessed 05/04/2019 2019].
- Noonan, F. P., Recio, J. A., Takayama, H., Duray, P., Anver, M. R., Rush, W. L., De Fabo, E. C. & Merlino, G. 2001. Neonatal sunburn and melanoma in mice. *Nature*, 413, 271-272.
- Okada, K., Moon, H. J., Finney, J., Meier, A. & Mure, M. 2018. Extracellular processing of lysyl oxidase-like 2 and its effect on amine oxidase activity. *Biochemistry*, 57, 6973-6983.
- Orriols, M., Guadall, A., Galán, M., Rodríguez-Calvo, R., Martí, I., Briones, A. M., Varona, S., Navarro, M. A., de Diego, A., Osada, J., Martínez-González, J. & Rodríguez, C. 2014. Lysyl oxidase (LOX) in vascular remodelling: insight from a new animal model. *Atherosclerosis*, 235, e43.
- Otsuka, T., Takayama, H., Sharp, R., Celli, G., LaRochelle, W. J., Bottaro, D. P., Ellmore, N., Vieira, W., Owens, J. W., Anver, M. R. & Merlino, G. 1998. c-Met autocrine activation induces development of malignant melanoma and acquisition of the metastatic phenotype. *Cancer Res*, 58, 5157-5167.
- Paddison, P. J., Caudy, A. A., Bernstein, E., Hannon, G. J. & Conklin, D. S. 2002. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev*, 16, 948-958.
- Panchenko, M. V., Stetler-Stevenson, W. G., Trubetskoy, O. V., Gacheru, S. N. & Kagan, H. M. 1996. Metalloproteinase activity secreted by fibrogenic cells in the processing of prolyl oxidase. *J Biol Chem*, 271, 7113-7119.
- Park, P., Jo, S., Kim, M., Kim, H., Lee, J. E., Park, C., Kim, H., Lee, K., Kim, H., Park, J., Dong, S. & Lee, J. 2017. Role of LOXL2 in the epithelial-mesenchymal transition and colorectal cancer metastasis. *Oncotarget*, 8, 80325-80335.
- Peinado, H., Iglesias-de la Cruz, M., D., O., Csiszar, K., Fong, K. S., Vega, S., Nieto, M. A., Cano, A. & Portillo, F. 2005. A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in Snail regulation and tumor progression. *EMBO J*, 24, 3446-3458.
- Peinado, H., Olmeda, D. & Cano, A. 2007. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*, 7, 415-428.
- Peinado, H., Moreno-Bueno, G., Hardisson, D., Perez-Gomez, E., Santos, V., Mendiola, M., de Diego, J. I., Nistal, M., Quintanilla, M., Portillo, F. & Cano, A. 2008. Lysyl oxidase-like 2 as a new poor prognosis marker of squamous cell carcinomas. *Cancer Res*, 68, 4541-4550.
- Peinado, H., Lavotshkin, S. & Lyden, D. 2011. The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts. *Semin Cancer Biol*, 21, 139-146.
- Peinado, H., Aleckovic, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., Garcia-Santos, G., Ghajar, C., Nitadori-Hoshino, A., Hoffman, C., Badal, K., Garcia, B. A., Callahan, M. K., Yuan, J., Martins, V. R., Skog, J., Kaplan, R. N., Brady, M. S., Wolchok, J. D., Chapman, P. B., Kang, Y., Bromberg, J. & Lyden, D. 2012. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med*, 18, 883-891.

- Peinado, H., Zhang, H., Matei, I. R., Costa-Silva, B., Hoshino, A., Rodrigues, G., Psaila, B., Kaplan, R. N., Bromberg, J. F., Kang, Y., Bissell, M. J., Cox, T. R., Giaccia, A. J., Erler, J. T., Hiratsuka, S., Ghajar, C. M. & Lyden, D. 2017. Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases. *Nat Rev Cancer*, 17, 302-317.
- Peng, L., Ran, Y. L., Hu, H., Yu, L., Liu, Q., Zhou, Z., Sun, Y. M., Sun, L. C., Pan, J., Sun, L. X., Zhao, P. & Yang, Z. H. 2009. Secreted LOXL2 is a novel therapeutic target that promotes gastric cancer metastasis via the Src/FAK pathway. *Carcinogenesis*, 30, 1660-1669.
- Perez-Guijarro, E., Day, C. P., Merlino, G. & Zaidi, M. R. 2017. Genetically engineered mouse models of melanoma. *Cancer*, 123, 2089-2103.
- Pinnell, S. & Martin, G. 1968. The cross-linking of collagen and elastin: enzymatic conversion of lysine in peptide linkage to α -amino adipic-6 semialdehyde (allysine) by an extract from bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 61, 708-716.
- Pischon, N., Maki, J. M., Weissaupt, P., Heng, N., Palamakumbura, A. H., N'Guessan, P., Ding, A., Radlanski, R., Renz, H., Bronckers, T. A., Myllyharju, J., Kielbassa, A. M., Kleber, B. M., Bernimoulin, J. P. & Trackman, P. C. 2009. Lysyl oxidase (lox) gene deficiency affects osteoblastic phenotype. *Calcif Tissue Int*, 85, 119-126.
- Polyak, K. & Weinberg, R. A. 2009. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer*, 9, 265-273.
- Potter, A. S. & Potter, S. S. 2015. Molecular anatomy of palate development. *PLoS One*, 10, doi: 10.1371/journal.pone.0132662. eCollection 0132015.
- Psaila, B. & Lyden, D. 2009. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer*, 9, 285-293.
- Queirolo, P., Boutros, A., Tanda, E., Spagnolo, F. & Quagliano, P. 2019. Immune-checkpoint inhibitors for the treatment of metastatic melanoma: a model of cancer immunotherapy. *Semin Cancer Biol*, doi: 10.1016/j.semcancer.2019.1008.1001. .
- Raghu, G., Brown, K., Collard, H., Cottin, V., Gibson, K., Kaner, R., Lederer, D., Martinez, F., Noble, P., Song, J., Wells, A., Whelan, T., Wuyts, W., Moreau, E., Patterson, S., Smith, V., Bayly, S., Chien, J., Gong, Q., Zhang, J. & O'Riordan, T. 2017. Efficacy of simtuzumab versus placebo in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: a randomised, double-blind, controlled, phase 2 trial. *Lancet Respir Med*, 16, doi: 10.1016/S2213-2600(16)30421-30420.
- Rebecchi, K. R., Go, E. P., Xu, L., Woodin, C. L., Mure, M. & Desaire, H. 2011. A general protease digestion procedure for optimal protein sequence coverage and post-translational modifications analysis of recombinant glycoproteins: application to the characterization of human lysyl oxidase-like 2 glycosylation. *Anal Chem*, 83, 8484-8491.
- Recio, J. A., Noonan, F. P., Takayama, H., Anver, M. R., Duray, P., Rush, W. L., Lindner, G., De Fabo, E. C., Depinho, R. & Merlino, G. 2002. Ink4a/Arf deficiency promotes ultraviolet radiation-induced melanomagenesis. *Cancer Res*, 62, 6724-6730.
- Reiser, K., McCormick, R. J. & Rucker, R. B. 1992. Enzymatic and nonenzymatic cross-linking of collagen and elastin. *FASEB J*, 6, 2439-2449.

- Remus, E. W., O'Donnell, R. E., Jr., Rafferty, K., Weiss, D., Joseph, G., Csiszar, K., Fong, S. F. & Taylor, W. R. 2012. The role of lysyl oxidase family members in the stabilization of abdominal aortic aneurysms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 303, 1067-1075.
- Ritch, R. 2008. Exfoliation syndrome: beyond glaucoma. *Arch Ophthalmol*, 126, 859-861.
- Rodriguez, C., Martinez-Gonzalez, J., Raposo, B., Alcudia, J. F., Guadall, A. & Badimon, L. 2008. Regulation of lysyl oxidase in vascular cells: lysyl oxidase as a new player in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res*, 79, 7-13.
- Rodriguez, H. M., Vaysberg, M., Mikels, A., McCauley, S., Velayo, A. C., Garcia, C. & Smith, V. 2010. Modulation of lysyl oxidase-like 2 enzymatic activity by an allosteric antibody inhibitor. *J Biol Chem*, 285, 20964-20974.
- Rowbottom, M. W., Bain, G., Calderon, I., Lasof, T., Lonergan, D., Lai, A., Huang, F., Darlington, J., Prodanovich, P., Santini, A. M., King, C. D., Goulet, L., Shannon, K. E., Ma, G. L., Nguyen, K., MacKenna, D. A., Evans, J. F. & Hutchinson, J. H. 2017. Identification of 4-(Aminomethyl)-6-(trifluoromethyl)-2-(phenoxy)pyridine derivatives as potent, selective, and orally efficacious inhibitors of the copper-dependent amine oxidase, lysyl oxidase-like 2 (LOXL2). *J Med Chem*, 60, 4403-4423.
- Royce, P. M., Camakaris, J. & Danks, D. M. 1980. Reduced lysyl oxidase activity in skin fibroblasts from patients with Menkes' syndrome. *Biochem J*, 192, 579-586.
- Sagebiel, R. W. 1993. Melanocytic Nevi in Histologic Association with Primary Cutaneous Melanoma of Superficial Spreading and Nodular Types: Effect of Tumor Thickness. *J Invest Dermatol*, 100, 322S-325S.
- Salvador, F. 2014. *Caracterización de modelos animales modificados genéticamente para Loxl2 en la fisiología y en la progresión de carcinomas*. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid.
- Salvador, F., Martin, A., Lopez-Menendez, C., Moreno-Bueno, G., Santos, V., Vazquez-Naharro, A., Santamaria, P. G., Morales, S., Dubus, P. R., Muinelo-Romay, L., Lopez-Lopez, R., Tung, J. C., Weaver, V. M., Portillo, F. & Cano, A. 2017. Lysyl Oxidase-like Protein LOXL2 Promotes Lung Metastasis of Breast Cancer. *Cancer Res*, 77, 5846-5859.
- Santamaria, P. G., Moreno-Bueno, G. & Cano, A. 2019. Contribution of epithelial plasticity to therapy resistance. *J Clin Med*, 8, doi: 10.3390/jcm8050676.
- Santamaría, P. G., Floristán, A., Fontanals-Cirera, B., Vázquez-Naharro, A., Santos, V., Morales, S., Yuste, L., Peinado, H., García-Gómez, A., Portillo, F., Hernando, E. & Cano, A. 2018. Lysyl oxidase-like 3 is required for melanoma cell survival by maintaining genomic stability. *Cell Death Differ*, 5, 935-950.
- Sarrias, M. R., Gronlund, J., Padilla, O., Madsen, J., Holmskov, U. & Lozano, F. 2004. The scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) domain: An ancient and highly conserved protein module of the innate immune system. *Crit Rev Immunol*, 24, 1-37.
- Sceneay, J., Smyth, M. J. & Moller, A. 2013. The pre-metastatic niche: finding common ground. *Cancer Metastasis Rev*, 32, 449-464.
- Schadendorf, D. & Hauschild, A. 2014. Melanoma in 2013: Melanoma the run of success continues. *Nat Rev Clin Oncol*, 11, 75-76.

- Schadendorf, D., Fisher, D. E., Garbe, C., Gershenwald, J. E., Grob, J.-J., Halpern, A., Herlyn, M., Marchetti, M. A., McArthur, G., Ribas, A., Roesch, A. & Hauschild, A. 2015. Melanoma. *Nat Rev Dis Primers*, 23, doi: 10.1038/nrdp.2015.1033.
- Schietke, R., Warnecke, C., Wacker, I., Schodel, J., Mole, D. R., Campean, V., Amann, K., Goppelt-Strube, M., Behrens, J., Eckardt, K. U. & Wiesener, M. S. 2010. The lysyl oxidases LOX and LOXL2 are necessary and sufficient to repress E-cadherin in hypoxia: insights into cellular transformation processes mediated by HIF-1. *J Biol Chem*, 285, 6658-6669.
- Schilter, H., Findlay, A. D., Perryman, L., Yow, T. T., Moses, J., Zahoor, A., Turner, C. I., Deodhar, M., Foot, J. S., Zhou, W., Greco, A., Joshi, A., Rayner, B., Townsend, S., Buson, A. & Jarolimek, W. 2019. The lysyl oxidase like 2/3 enzymatic inhibitor, PXS-5153A, reduces crosslinks and ameliorates fibrosis. *J Cell Mol Med*, 23, 1759-1770.
- Sebban, S., Davidson, B. & Reich, R. 2009. Lysyl oxidase-like 4 is alternatively spliced in an anatomic site-specific manner in tumors involving the serosal cavities. *Virchows Arch*, 454, 71-79.
- Sebban, S., Golan-Gerstl, R., Karni, R., Vaksman, O., Davidson, B. & Reich, R. 2013. Alternatively spliced lysyl oxidase-like 4 isoforms have a pro-metastatic role in cancer. *Clin Exp Metastasis*, 30, 103-117.
- Shain, A. H. & Bastian, B. C. 2016. From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer*, 16, 345-358.
- Sharpless, N. E., Kannan, K., Xu, J., Bosenberg, M. W. & Chin, L. 2003. Both products of the mouse Ink4a/Arf locus suppress melanoma formation in vivo. *Oncogene*, 22, 5055-5059.
- Sheppard, K. E. & McArthur, G. A. 2013. The cell-cycle regulator CDK4: an emerging therapeutic target in melanoma. *Clin Cancer Res*, 19, 5320-5318.
- Shull, A. Y., Latham-Schwark, A., Ramasamy, P., Leskoske, K., Oroian, D., Birtwistle, M. R. & Buckhaults, P. J. 2012. Novel somatic mutations to PI3K pathway genes in metastatic melanoma. *PLoS One*, 7, doi: 10.1371/journal.pone.0043369. .
- Sibon, I., Sommer, P., Lamaziere, J. M. & Bonnet, J. 2005. Lysyl oxidase deficiency: a new cause of human arterial dissection. *Heart*, 91, e33.
- Siegel, R. C., Chen, K. H., Greenspan, J. S. & Aguiar, J. M. 1978. Biochemical and immunochemical study of lysyl oxidase in experimental hepatic fibrosis in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75, 2945-2949.
- Smith-Mungo, L. I. & Kagan, H. M. 1998. Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology. *Matrix Biol*, 16, 387-398.
- Snead, M. P. & Yates, J. R. 1999. Clinical and molecular genetics of Stickler syndrome. *J Med Genet*, 36, 353-359.
- Soengas, M. S. & Patton, E. E. 2017. Location, location, location: spatio-temporal cues that define the cell of origin in melanoma. *Cell Stem Cell*, 21, 559-561.
- Sotillo, R., Garcia, J. F., Ortega, S., Martin, J., Dubus, P., Barbacid, M. & Malumbres, M. 2001. Invasive melanoma in Cdk4-targeted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 13312-13317.
- Taddei, M. L., Giannoni, E., Comito, G. & Chiarugi, P. 2013. Microenvironment and tumor cell plasticity: an easy way out. *Cancer Lett*, 341, 80-96.

- Tadmor, T., Bejar, J., Attias, D., Mischenko, E., Sabo, E., Neufeld, G. & Vadasz, Z. 2013. The expression of lysyl-oxidase gene family members in myeloproliferative neoplasms. *Am J Hematol*, 88, 355-358.
- Tanaka, N., Yamada, S., Sonohara, F., Suenaga, M., Hayashi, M., Takami, H., Niwa, Y., Hattori, N., Iwata, N., Kanda, M., Tanaka, C., Kobayashi, D., Nakayama, G., Koike, M., Fujiwara, M., Fujii, T. & Kodera, Y. 2018. Clinical implications of lysyl oxidase-like protein 2 expression in pancreatic cancer. *Sci Rep*, 8, doi: 10.1038/s41598-41018-28253-41599.
- Tarkkanen, A. 2008. Is exfoliation syndrome a sign of systemic vascular disease? *Acta Ophthalmol*, 86, 832-836.
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. & Nieto, M. A. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139, 871-890.
- Thoreifsson, G., Magnusson, K. P., Sulem, P., Walters, G. B., Gudbjartsson, D. F., Stefansson, H., Jonsson, T., Jonasdottir, A., A. J., Stefansdottir, G., Masson, G., Hardarson, G. A., Petursson, H., Amarsson, A., Motallebipour, M., Wallerman, O., Wadelius, C., Gulcher, J. R., Thorsteindottir, U., Kong, A., Jonasson, F. & Stefansson, K. 2007. Common sequence variants in the LOXL1 gene confer susceptibility to exfoliation glaucoma. *Science*, 317, 1397-1400.
- Tormo, D., Ferrer, A., Gaffal, E., Wenzel, J., Basner-Tschakarjan, E., Steitz, J., Heukamp, L. C., Gutgemann, I., Buettner, R., Malumbres, M., Barbacid, M., Merlino, G. & Tuting, T. 2006. Rapid growth of invasive metastatic melanoma in carcinogen-treated hepatocyte growth factor/scatter factor-transgenic mice carrying an oncogenic CDK4 mutation. *Am J Pathol*, 169, 665-672.
- Torres, S., Garcia-Palmero, I., Herrera, M., Bartolome, R. A., Pena, C., Fernandez-Acenero, M. J., Padilla, G., Pelaez-Garcia, A., Lopez-Lucendo, M., Rodriguez-Merlo, R., Garcia de Herreros, A., Bonilla, F. & Casal, J. I. 2015. LOXL2 is highly expressed in cancer-associated fibroblasts and associates to poor colon cancer survival. *Clin Cancer Res*, 21, 4892-4902.
- Trackman, P. C., Bedell-Hogan, D., Tang, J. & Kagan, H. M. 1992. Post-translational glycosylation and proteolytic processing of a lysyl oxidase precursor. *J Biol Chem*, 267, 8666-8671.
- Trackman, P. C. 2016a. Enzymatic and non-enzymatic functions of the lysyl oxidase family in bone. *Matrix Biol*, 52-54, 7-18.
- Trackman, P. C. 2016b. Lysyl oxidase isoforms and potential therapeutic opportunities for fibrosis and cancer. *Expert Opin Ther Targets*, 20, 935-945.
- Tsao, H., Goel, V., Wu, H., Yang, G. & Haluska, F. G. 2004. Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol*, 122, 337-341.
- Uzel, M. I., Scott, I. C., Babakhanlou-Chase, H., Palamakumbura, A. H., Pappano, W. N., Hong, H. H., Greenspan, D. S. & Trackman, P. C. 2001. Multiple bone morphogenetic protein 1-related mammalian metalloproteinases process pro-lysyl oxidase at the correct physiological site and control lysyl oxidase activation in mouse embryo fibroblast cultures. *J Biol Chem*, 276, 22537-22543.

- Vadasz, Z., Kessler, O., Akiri, G., Gengrinovitch, S., Kagan, H. M., Baruch, Y., Izhak, O. B. & Neufeld, G. 2005. Abnormal deposition of collagen around hepatocytes in Wilson's disease is associated with hepatocyte specific expression of lysyl oxidase and lysyl oxidase like protein-2. *J Hepatol*, 43, 499-507.
- Valastyan, S. & Weinberg, R. A. 2011. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147, 275-292.
- van Boxtel, A. L., Gansner, J. M., Hakvoort, H. W., Snell, H., Legler, J. & Gitlin, J. D. 2011. Lysyl oxidase-like 3b is critical for cartilage maturation during zebrafish craniofacial development. *Matrix Biol*, 30, 178-187.
- Van den Broeck, W., Derore, A. & Simoens, P. 2006. Anatomy and nomenclature of murine lymph nodes: descriptive study and nomenclatory standardization in BALB/cAnNCrl mice. *J Immunol Methods*, 312, 12-19.
- Van Raamsdonk, C. D., Griewank, K. G., Crosby, M. B., Garrido, M. C., Vemula, S., Wiesner, T., Obenaus, A. C., Wackernagel, W., Green, G., Bouvier, N., Sozen, M. M., Baimukanova, G., Roy, R., Heguy, A., Dolgalev, I., Khanin, R., Busam, K., Speicher, M. R., O'Brien, J. & Bastian, B. C. 2010. Mutations in GNA11 in uveal melanoma. *N Engl J Med*, 363, 2191-2199.
- Verstovsek, S., Savona, M., Mesa, R., Dong, H., Maltzman, J., Sharma, S., Silverman, J., Oh, S. & Gotlib, J. 2016. A phase 2 study of simtuzumab in patients with primary, post-polycythaemia vera or post-essential thrombocythaemia myelofibrosis. *Br J Haematol*, 176, 939-949.
- Viros, A., Sanchez-Laorden, B., Pedersen, M., Furney, S. J., Rae, J., Hogan, K., Ejima, S., Girotti, M. R., Cook, M., Dhomen, N. & Marais, R. 2014. Ultraviolet radiation accelerates BRAF-driven melanomagenesis by targeting TP53. *Nature*, 511, 478-482.
- Vitiello, M., Evangelista, M., Di Lascio, N., Kusmic, C., Massa, A., Orso, F., Sarti, S., Marranci, A., Rodzik, K., Germelli, L., Chandra, D., Salvetti, A., Pucci, A., Taverna, D., Fata, F., Gravekamp, C. & Polisenio, L. 2019. Antitumoral effects of attenuated *Listeria monocytogenes* in a genetically engineered mouse model of melanoma. *Oncogene*, 38, 3756-3762.
- Voloshenyuk, T. G., Hart, A. D., Khoutorova, E. & Gardner, J. D. 2011. TNF-alpha increases cardiac fibroblast lysyl oxidase expression through TGF-beta and PI3Kinase signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun*, 413, 370-375.
- Wang, C., Xu, S., Tian, Y., Ju, A., Hou, Q., Liu, J., Fu, Y. & Luo, Y. 2019. Lysyl Oxidase-Like Protein 2 Promotes Tumor Lymphangiogenesis and Lymph Node Metastasis in Breast Cancer. *Neoplasia*, 21, 413-427.
- Wang, T. H., Hsia, S. M. & Shieh, T. M. 2016. Lysyl Oxidase and the Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci*, 18, doi: 10.3390/ijms18010062.
- Wang, V., Davis, D. A. & Yarchoan, R. 2017. Identification of functional hypoxia inducible factor response elements in the human lysyl oxidase gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun*, 490, 480-485.
- Willis, B. C., Johnson, G., Wang, J. & Cohen, C. 2015. SOX10: a useful marker for identifying metastatic melanoma in sentinel lymph nodes. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 23, 109-112.

- Wong, C. C., Gilkes, D. M., Zhang, H., Chen, J., Wei, H., Chaturvedi, P., Fraley, S. I., Wong, C. M., Khoo, U. S., Ng, I. O., Wirtz, D. & Semenza, G. L. 2011. Hypoxia-inducible factor 1 is a master regulator of breast cancer metastatic niche formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 16369-16374.
- Wong, C. C., Tse, A. P., Huang, Y. P., Zhu, Y. T., Chiu, D. K., Lai, R. K., Au, S. L., Kai, A. K., Lee, J. M., Wei, L. L., Tsang, F. H., Lo, R. C., Shi, J., Zheng, Y. P., Wong, C. M. & Ng, I. O. 2014. Lysyl oxidase-like 2 is critical to tumor microenvironment and metastatic niche formation in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 60, 1645-1658.
- Wu, Y., Li, Z., Shi, Y., Chen, L., Tan, H., Wang, Z., Yin, C., Liu, L. & Hu, J. 2018. Exome sequencing identifies LOXL2 mutation as a cause of familial intracranial aneurysm. *World Neurosurg*, 109, e812-e818.
- Xu, L., Go, E. P., Finney, J., Moon, H., Lantz, M., Rebecchi, K., Desaire, H. & Mure, M. 2013. Post-translational modifications of recombinant human lysyl oxidase-like 2 (rhLOXL2) secreted from *Drosophila* S2 cells. *J Biol Chem*, 288, 5357-5363.
- Yang, J., Savvatis, K., Kang, J. S., Fan, P., Zhong, H., Schwartz, K., Barry, V., Mikels-Vigdal, A., Karpinski, S., Korniyev, D., Adamkewicz, J., Feng, X., Zhou, Q., Shang, C., Kumar, P., Phan, D., Kasner, M., Lopez, B., Diez, J., Wright, K. C., Kovacs, R. L., Chen, P. S., Quertermous, T., Smith, V., Yao, L., Tschope, C. & Chang, C. P. 2016. Targeting LOXL2 for cardiac interstitial fibrosis and heart failure treatment. *Nat Commun*, 7, doi: 10.1038/ncomms13710.
- Zhan, P., Lv, X. J., Ji, Y. N., Xie, H. & Yu, L. K. 2018. Increased lysyl oxidase-like 2 associates with a poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Clin Respir J*, 12, 712-720.
- Zhan, X. H., Jiao, J. W., Zhang, H. F., Xu, X. E., He, J. Z., Li, R. L., Zou, H. Y., Wu, Z. Y., Wang, S. H., Wu, J. Y., Liao, L. D., Wang, J. J., Cheng, Y. W., Zhang, K., Neufeld, G., Xu, L. Y. & Li, E. M. 2019. LOXL2 upregulates phosphorylation of ezrin to promote cytoskeletal reorganization and tumor cell invasion. *Cancer Res*, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-1119-0860. .
- Zhang, J., Yang, R., Liu, Z., Hou, C., Zong, W., Zhang, A., Sun, X. & Gao, J. 2015. Loss of lysyl oxidase-like 3 causes cleft palate and spinal deformity in mice. *Hum Mol Genet*, 24, 6174-6185.
- Zhang, J., Liu, Z., Zhang, T., Lin, Z., Li, Z., Zhang, A., Sun, X. & Gao, J. 2016. Loss of lysyl oxidase-like 3 attenuates embryonic lung development in mice. *Sci Rep*, 6, doi: 10.1038/srep33856.
- Zhao, Y., Tang, K., Tianbao, X., Wang, J., Yang, J. & Li, D. 2017. Increased serum lysyl oxidase-like 2 levels correlate with the degree of left atrial fibrosis in patients with atrial fibrillation. *Biosci Rep*, 37, doi: 10.1042/BSR20171332. .
- Zhou, Y., Ling, O. & Bo, L. 2013. Expression and significance of lysyl oxidase-like 1 and fibulin-5 in the cardinal ligament tissue of patients with pelvic floor dysfunction. *J Biomed Res*, 27, 23-28.
- Zhu, S., Zhang, X., Weichert-Leahey, N., Dong, Z., Zhang, C., Lopez, G., Tao, T., He, S., Wood, A. C., Oldridge, D., Ung, C. Y., van Ree, J. H., Khan, A., Salazar, B. M., Lummertz da Rocha, E., Zimmerman, M. W., Guo, F., Cao, H., Hou, X., Weroha, S. J., Perez-Atayde, A. R., Neubergh, D. S., Meves, A., McNiven, M. A., van Deursen, J. M., Li, H., Maris, J.

BIBLIOGRAFÍA

- M. & Look, A. T. 2017. LMO1 synergizes with MYCN to promote neuroblastoma initiation and metastasis. *Cancer Cell*, 32, 310-323
- Zuo, L., Weger, J., Yang, Q., Goldstein, A. M., Tucker, M. A., Walker, G. J., Hayward, N. K. & Dracopoli, N. C. 1996. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CD4 in familial melanoma. *Nat Genet*, 12, 97-99.